



# UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE  
United States Patent and Trademark Office  
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450  
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
10/662,517	09/16/2003	Sang Yup Lee	Q77445	2292
23373	7590	04/24/2006	EXAMINER	
SUGHRUE MION, PLLC 2100 PENNSYLVANIA AVENUE, N.W. SUITE 800 WASHINGTON, DC 20037			PROUTY, REBECCA E	
			ART UNIT	PAPER NUMBER
			1652	

DATE MAILED: 04/24/2006

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****U.S. Patent and Trademark Office**

Address: COMMISSIONER FOR PATENTS

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

10 | 662,517

APPLICATION NO./ CONTROL NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR / PATENT IN REEXAMINATION	ATTORNEY DOCKET NO.
---------------------------------	-------------	---	---------------------

EXAMINER
----------

ART UNIT	PAPER
----------	-------

406

**DATE MAILED:**

**Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.**

**Commissioner for Patents**

A copy of the machine assisted translation of Hamamoto et al. (JP 09-009982) cited in the last Office Action is provided.

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to Rebecca E. Prouty whose telephone number is 571-272-0937. The examiner can normally be reached on Tuesday-Friday from 8 AM to 5 PM. The examiner can also be reached on alternate Mondays

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Ponnathapura Achutamurthy, can be reached at (571) 272-0928. The fax phone number for this Group is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).

Rebecca E. Prouty  
Primary Examiner  
Art Unit: 1652

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

<b>(19)【発行国】</b> 日本国特許庁 ( J P )	<b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b> Japan Patent Office (JP)
<b>(12)【公報種別】</b> 公開特許公報 ( A )	<b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b> Laid-open Kokai Patent (A)
<b>(11)【公開番号】</b> 特開平 9-9982	<b>(11)[KOKAI NUMBER]</b> Unexamined Japanese Patent Heisei 9-9982
<b>(43)【公開日】</b> 平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 1 月 1 4 日	<b>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]</b> January 14, Heisei 9 (1997. 1.14)
<b>(54)【発明の名称】</b> L-含硫アミノ酸の製造法	<b>(54)[TITLE OF THE INVENTION]</b> The production of L- sulfur containing amino acid
<b>(51)【国際特許分類第 6 版】</b> C12P 13/12 C12N 1/21 ZNA // C07H 21/04  C12N 9/10 9/88 15/09 (C12P 13/12  C12R 1:19 ) (C12N 1/21 C12R 1:19 )	<b>(51)[IPC 6]</b> C12P 13/12 C12N 1/21 ZNA // C07H 21/04  C12N 9/10 9/88 15/09 (C12P 13/12  C12R 1:19 ) (C12N 1/21 C12R 1:19 )
<b>【 F I 】</b>	<b>[FI]</b>

C12P 13/12      B      C12P 13/12      B  
C      C  
C12N    1/21      ZNA C12N    1/21      ZNA    7804-4B  
7804-4B

C07H 21/04      B      C07H 21/04      B  
C12N    9/10      C12N    9/10  
9/88      9/88  
15/00      A 15/00      A 9162-4B  
9162-4B

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 9

[NUMBER OF CLAIMS] 9

【出願形態】 O L

[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 20

[NUMBER OF PAGES] 20

(21) 【出願番号】  
特願平 7-168931(21)[APPLICATION NUMBER]  
Japanese Patent Application Heisei 7-168931(22) 【出願日】  
平成 7 年 ( 1 9 9 5 ) 7 月 4 日(22)[DATE OF FILING]  
July 4, Heisei 7 (1995. 7.4)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】  
591178012[ID CODE]  
591178012【氏名又は名称】  
財団法人地球環境産業技術研究  
機構[NAME OR APPELLATION]  
Research Institute of Innovative Technology for  
the Earth【住所又は居所】  
京都府相楽郡木津町木津川台 9

[ADDRESS OR DOMICILE]

丁目 2 番地

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

畑本 修

Hatomoto, Osamu

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

千葉県野田市野田 3 3 9 番地  
キッコーマン株式会社内

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

野口 薫

Noguchi, Kaoru

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

千葉県野田市野田 3 3 9 番地  
キッコーマン株式会社内

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

松山 旭

Matsuyama, Akira

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

千葉県野田市野田 3 3 9 番地  
キッコーマン株式会社内

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

大竹 秀子

Otake, Hideko

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

千葉県野田市野田 3 3 9 番地

キッコーマン株式会社内

**(72) 【発明者】****(72)[INVENTOR]****【氏名】****[NAME OR APPELLATION]**

中野 衛一

Nakano, Eiichi

**【住所又は居所】****[ADDRESS OR DOMICILE]**千葉県野田市野田 3 3 9 番地  
キッコーマン株式会社内**(74) 【代理人】****(74)[AGENT]****【弁理士】****[PATENT ATTORNEY]****【氏名又は名称】****[NAME OR APPELLATION]**

平木 祐輔 (外 1 名)

Hiraki, Yusuke (and 1 other)

**(57) 【要約】****(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]****【解決手段】****[PROBLEM TO BE SOLVED]**

(A) L-セリンと、(B) 硫化物と、(C) アセチルCoAと、(D)アセチルリン酸と、(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

It forms L- sulfur containing amino acid by letting the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which each codes (A) L-serine, (B) sulfide, (C) acetyl CoA, (D) acetyl phosphate, (K) serine acetyltransferase (SAT), phospho trans acetylase (PTA), and O-acetyl serine lyase (OASL) in Vector DNA, and/or the treated substance react.

The manufacturing method of L- sulfur containing amino acid characterized by the above-mentioned.

**【効果】**

L-セリンからL-含硫アミノ酸を簡便に、しかも従来法と比較して、高収率で製造することができる。しかも、PTAとアセチルリン酸との存在下で反応を行うことから、大量のアセチルCoAを添加する必要がなく、L-含硫アミノ酸を安価に製造することができる。

**[ADVANTAGE]**

It can easily manufacture L- sulfur containing amino acid from L- serine, moreover, by a high-yield rate compared with a conventional method.

And since it performs reaction in the presence of PTA and acetyl phosphate, it is not necessary to add a lot of acetyl CoA, and can cheaply manufacture L- sulfur containing amino acid

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項1】**

(A) L-セリンと、(B) 硫化物と、(C) アセチルCoAと、(D) アセチルリン酸と、(E) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、  
(F) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、  
(G) O-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL

**[CLAIM 1]**

A manufacturing method of L- sulfur containing amino acid, in which it makes microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (A) L- serine, (B) sulfide, (C) acetyl CoA, (D) acetyl phosphate, (E) serine acetyltransferase (SAT) into vector DNA, and/or the treated substance, microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (F) phospho trans acetylase (PTA) into vector DNA, and/or the treated substance, and microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (G) O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance, react and forms L- sulfur containing amino acid.

ー含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、Lー含硫アミノ酸の製造方法。

**【請求項 2】**

(A) Lーセリンと、  
(B) 硫化物と、  
(C) アセチルCoAと、  
(D) アセチルリン酸と、(F')少なくともホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、  
(H) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびOーアセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてLー含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、Lー含硫アミノ酸の製造方法。

**【請求項 3】**

(A) Lーセリンと、  
(B) 硫化物と、  
(C) アセチルCoAと、  
(D) アセチルリン酸と、(E')少なくともセリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形

**[CLAIM 2]**

A manufacturing method of L- sulfur containing amino acid, in which it makes microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (A) L- serine, (B) sulfide, (C) acetyl CoA, (D) acetyl phosphate, (F') at least phospho trans acetylase (PTA) into Vector DNA and/or the treated substance, and microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which each codes (H) serine acetyltransferase (SAT) and O-acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

**[CLAIM 3]**

A manufacturing method of L- sulfur containing amino acid, in which it makes microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (A) L- serine, (B) sulfide, (C) acetyl CoA, (D) acetyl phosphate, (E') at least serine acetyltransferase (SAT) into Vector DNA and/or the treated substance,



質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、

(I) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which each codes (I) phospho trans acetylase (PTA) and O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

【請求項 4】

(A) L-セリンと、  
(B) 硫化物と、  
(C) アセチルCoAと、  
(D) アセチルリン酸と、(G')少なくともO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、  
(J) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

[CLAIM 4]

A manufacturing method of L- sulfur containing amino acid, in which it makes microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which codes (A) L- serine, (B) Sulfide, (C) Acetyl CoA, (D) Acetyl phosphate, (G') at least O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance, microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds which each codes (J) serine acetyltransferase (SAT) and the phospho trans acetylase (PTA) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

**【請求項 5】**

(A) L-セリンと、  
(B) 硫化物と、  
(C) アセチルCoAと、  
(D) アセチルリン酸と、(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

**[CLAIM 5]**

A manufacturing method of L- sulfur containing amino acid, in which it makes microbial cell of microorganisms transformed by recombinant body DNA which builds DNA which each codes (A) L- serine, (B) sulfide, (C) acetyl CoA, (D) acetyl phosphate, (K) serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

**【請求項 6】**

セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNA。

**[CLAIM 6]**

The recombinant body DNA which integrated DNA which each codes the serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) in Vector DNA.

**【請求項 7】**

セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAが大腸菌由来のものである請求項 6 に記載の組換え

**[CLAIM 7]**

The recombinant body DNA of Claim 6 whose DNA which each codes the serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) is a thing derived from an Escherichia coli.

体DNA。

**【請求項 8】**

請求項 6 または 7 に記載の組換え体DNAにて形質転換した微生物。

**[CLAIM 8]**

Microorganisms transformed with the recombinant body DNA of Claim 6 or 7.

**【請求項 9】**

微生物が大腸菌である、請求項 8 に記載の微生物。

**[CLAIM 9]**

Microorganisms of Claim 8 whose microorganisms are Escherichia colis.

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【発明の属する技術分野】**

本発明は、組換え体DNAにて形質転換した微生物が産生する、セリンアセチルトランスフェラーゼ（以下、SATという。）、ホスホトランスアセチラーゼ（以下、PTAという。）およびO-アセチルセリンリアーゼ（以下、OASLという。）を利用したL-含硫アミノ酸の製造方法に関する。

**[TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION]**

This invention relates to the manufacturing method using the serine acetyltransferase (henceforth SAT), phospho trans acetylase (henceforth PTA), and O- acetyl serine lyase (henceforth OASL) which the microorganisms transformed with the recombinant body DNA produce of L- sulfur containing amino acid.

**【0002】****[0002]****【従来の技術】**

L-含硫アミノ酸、すなわちL-システインやL-シスチンは、化粧品、医薬品、食品添加物等として有用である。そのようなL-含硫アミノ酸の酵素的

**[PRIOR ART]**

L- sulfur containing amino acid, i.e., L- cystein and L- cystine, is useful as cosmetics, a pharmaceutical, food additive, etc. It lets L- serine, the acetyl CoA, and the sulfide react in the presence of SAT and OASL as one

生産法の一つとして、SATおよびOASLの存在下、L-セリン、アセチルCoAおよび硫化物を反応させ、反応物中にL-含硫アミノ酸を生成させる方法が提案されている。

(N.M.Kredich, G.M.Tomkins : J. Bacteriol., 241, 4955-4965(1966))。しかしながら、この反応では、高価なアセチルCoAを大量に必要とすること、SAT活性が生成したL-含硫アミノ酸により厳しいフィードバック阻害 (feedback inhibition) を受けるため

(D.Denk, A.Bock, : J. Gen. Microbiol., 133, 515-525 (1987) )、L-含硫アミノ酸の生産量が極めて低いことなどの問題点を有している。

of the enzymatic producing methods of such a L- sulfur containing amino acid.

The method of forming L- sulfur containing amino acid in a reaction material is proposed (N.M.Kredich, G.M.Tomkins: J.Bacteriol., 241, 4955-4965 (1966)).

However, at this reaction, in order for L- sulfur containing amino acid which needing the expensive acetyl CoA in large quantities and SAT activity formed to receive a severe feedback inhibition (feedback inhibition) (D.Denk, A.Bock : J.Gen.Microbiol., 133,515-525 (1987)), it has problems, like the throughput of L- sulfur containing amino acid is very low.

### 【0003】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、微生物が産生するSATおよびOASLを利用して、L-セリン、アセチルCoA、および硫化物を反応させてL-含硫アミノ酸を生成させる方法において、高価なアセチルCoAを大量に使用することなく、L-含硫アミノ酸を、簡便、高収率で、かつ安価に製造する方法を提供することにある。

### [0003]

#### [PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

The problem of this invention utilizes SAT and OASL which microorganisms produce, in L-serine, the acetyl CoA, and the method of letting the sulfide react and forming L- sulfur containing amino acid, it is providing the method of being simply and a high-yield rate and cheaply manufacturing L- sulfur containing amino acid, without using the expensive acetyl CoA in large quantities.

【 0 0 0 4 】

**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究した結果、微生物が産生するSATおよびOASLを利用して、L-セリン、アセチルCoA、および硫化物を反応させてL-含硫アミノ酸を生成させる際に、PTAおよびアセチルリン酸の存在下で反応を行うと、L-セリンからL-含硫アミノ酸が合成されると同時に、消費されたアセチルCoAが再生されるので、大量のアセチルCoAを添加することなしに高収率でL-含硫アミノ酸を合成することができるとの知見を得た。本発明はその知見に基づいて完成されたものである。

【 0 0 0 5 】

すなわち、本発明は、(A) L-セリンと、(B) 硫化物と、(C) アセチルCoAと、(D) アセチルリン酸と、(E) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、

【 0 0 0 6 】

[0004]

**[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

The present inventors did earnest research, in order to solve said problem.

As a result, it utilizes SAT and OASL which microorganisms produce, the consumed acetyl CoA is regenerated at the same time L- sulfur containing amino acid will be compounded from L- serine if reaction is performed in the presence of PTA and acetyl phosphate when letting L- serine, the acetyl CoA, and the sulfide react and forming L- sulfur containing amino acid, depend.

It acquired findings that it is L- sulfur containing amino acid possible to synthesise by a high-yield rate, without adding a lot of acetyl CoA.

This invention was perfected based on the findings.

[0005]

Namely, this invention, (A) L- serine, (B) Sulfide, (C) Acetyl CoA, (D) Acetyl phosphate, (E) Microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms which transformed DNA which codes serine acetyltransferase (SAT) with recombinant body DNA built into vector DNA,

[0006]

(F) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、(G) O-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

**【0007】**

また、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(F')少なくともホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、(H) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

(F) Microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms which transformed DNA which codes phospho trans acetylase (PTA) with recombinant body DNA built into vector DNA, (G) It lets the microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms which transformed DNA which codes O- acetyl serine lyase (OASL) with the recombinant body DNA built into Vector DNA react, and form L- sulfur containing amino acid. It provides the manufacturing method of L- sulfur containing amino acid characterized by the above-mentioned.

**[0007]**

Moreover, this invention provides the manufacturing method of L- sulfur containing amino acid in which it makes the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which codes the above-mentioned (A)-(D) component and (F') at least phospho trans acetylase (PTA) into Vector DNA and/or the treated substance, and the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which each codes (H) serine acetyltransferase (SAT) and O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

**【 0 0 0 8 】**

更に、本発明は、上記(A) ～(D)成分と、(E')少なくともセリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、(I) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

**【 0 0 0 9 】**

更に、本発明は、上記(A) ～(D)成分と、(G')少なくともO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物と、(J) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および／

**[0008]**

Furthermore, this invention provides the manufacturing method of L- sulfur containing amino acid in which it makes the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which codes the above-mentioned (A)-(D) component and (E') at least serine acetyltransferase (SAT) into Vector DNA and/or the treated substance, and microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which each codes (I) phospho trans acetylase (PTA) and O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance react, and forms L- sulfur containing amino acid.

**[0009]**

Furthermore, this invention provides the manufacturing method of L- sulfur containing amino acid in which it makes the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which codes the above-mentioned (A)-(D) component and (G') at least O- acetyl serine lyase (OASL) into Vector DNA and/or the treated substance, and the microbial cell of microorganisms transformed by the recombinant body DNA which builds DNA which each codes (J) serine acetyltransferase (SAT) and the phospho trans acetylase (PTA) into Vector DNA and/or the treated substance

またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

react, and forms L- sulfur containing amino acid.

#### 【0010】

更に、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

#### [0010]

Furthermore, this invention is the above-mentioned (A)-(D) component, (K) It lets the microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms which transformed DNA which each codes the serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) with the recombinant body DNA built into Vector DNA react, and form L- sulfur containing amino acid.

It provides the manufacturing method of L- sulfur containing amino acid characterized by the above-mentioned.

#### 【0011】

更に、本発明は、セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAを提供する。更に、本発明は、セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれ

#### [0011]

Furthermore, this invention provides the recombinant body DNA which integrated DNA which each codes the serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) in Vector DNA. Furthermore, this invention provides the microorganisms which transformed DNA which each codes the serine acetyltransferase (SAT), the phospho trans acetylase (PTA), and O- acetyl serine lyase (OASL) with the recombinant body DNA built into Vector DNA.



れコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物を提供する。

**【0012】**

以下、本発明を詳細に説明する。

**(A) ～(D) 成分**

本発明は、微生物の産生する酵素、すなわちSAT、PTAおよびOASLを利用して、(A) L-セリン、(B) 硫化物、(C) アセチルCoA、および(D) アセチルリン酸を反応させて、L-セリンからL-含硫アミノ酸を合成するものである。消費されたアセチルCoAの再生酵素であるPTAの存在下で反応させることから、原料として高価なアセチルCoAの添加量を低く抑えることができ、(C) 成分のアセチルCoAの添加量はL-セリン1 mmol 当たり、通常、0.0005～1 mmol、好ましくは0.001～0.5mmol である。

**【0013】**

また、(B) 成分の硫化物としては、例えば、硫化水素、硫化ナトリウム、硫化カリウム、水硫化ナトリウム等が挙げられる。硫化物の添加量は、L-セリン1 mmol 当たり、通常、0.1～1 mmol である。(D) 成分のアセチルリン酸の添加量は、L-セリン1 mmol 当たり、通常、

**[0012]**

Hereafter, it demonstrates this invention in detail.

**(A) -(D) Component**

This invention utilizes the enzyme which microorganisms produce, i.e., SAT and PTA, and OASL, (A) L- serine, (B) Sulfide, (C) Acetyl CoA, it reaches.

(D) It lets acetyl phosphate react.

It compounds L- sulfur containing amino acid from L- serine.

Since it is made to react in the presence of PTA which is the consumed reproduction enzyme of the acetyl CoA, it can restrain low the additional amount of the acetyl CoA expensive as a raw material, the additional amount of the acetyl CoA of the (C) component is usually 0.0005 to 1 mmol per L- serine 1 mmol, preferably 0.001 to 0.5 mmol.

**[0013]**

Moreover, (B) As sulfide of the component, the hydrogen sulfide, sodium sulfide, potassium sulfide, a sodium hydrosulfide, etc. are mentioned, for example.

The additional amount of the sulfide is usually 0.1 to 1 mmol per L- serine 1 mmol.

the additional amount of the acetyl phosphate of the (D) component is usually 0.05 to 2 mmol per L- serine 1 mmol, preferably 0.1 to 0.6 mmol.

0.05～2 mmol、好ましくは 0.1  
～0.6mmol である。

**【0014】**

(E) ～(K)、(E')、(F')および(G')

成分

(E) 成分はSATをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(F) 成分はPTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(G) 成分はOASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、

**[0014]**

(E) -(K) (E'), (F'), and (G') component

(E) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which codes SAT in vector DNA, (F) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which codes PTA in vector DNA, (G) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which codes OASL in vector DNA,

**【0015】**

(H) 成分はSATおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(I) 成分はPTAおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(J) 成分はSATおよびPTAをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、

**[0015]**

(H) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which each codes SAT and OASL in vector DNA, (I) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which each codes PTA and OASL in vector DNA, (J) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which each codes SAT and PTA in vector DNA,

**【0016】**

(K) 成分はSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(E')成分は少なくともSATをコードするDNAをベクターD

**[0016]**

(K) Component is recombinant body DNA which integrated DNA which each codes SAT, PTA, and OASL in vector DNA, (E') The component is the recombinant body DNA which integrated DNA which codes SAT at least in Vector DNA, (F') The component is the

NAに組込んだ組換え体DNAにより、(F')成分は少なくともPTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(G')成分は少なくともOASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、形質転換した微生物の菌体および／またはその処理物である。

recombinant body DNA which integrated DNA which codes PTA at least in Vector DNA, (G') The component is the microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms which were transformed with the recombinant body DNA which integrated DNA which codes OASL at least in Vector DNA.

**【0017】**

尚、(E')成分は、具体的には、(E)成分、(H)成分、(J)成分および(K)成分から選ばれる。(F')成分は、具体的には、(F)成分、(I)成分、(J)成分および(K)成分から選ばれる。(G')成分は、具体的には、(G)成分、(H)成分、(I)成分および(K)成分から選ばれる。上記のSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードする遺伝子は、どのような微生物に由来するものでもよいが、特に、遺伝的、構造的に解明されている大腸菌由来のものが好適に用いられる。

**[0017]**

In addition, specifically, (E') component is, (E) Component, (H) Component, (J) Component It reaches.

(K) It is chosen out of the component.

(F')

Specifically, the component is, (F) Component, (I) Component, (J) Component It reaches.

(K) It is chosen out of the component.

(G')

Specifically, the component is, (G) Component, (H) Component, (I) Component It reaches.

(K) It is chosen out of the component.

Although the thing originating in what kind of microorganisms is also possible for the gene which each codes above SAT, PTA, and OASL, the thing derived from the Escherichia coli currently particularly clarified hereditarily and structurally is used suitably.

**【0018】**

また、本発明に用いるベクターDNAとしては、如何なるもの

**[0018]**

Moreover, as a vector DNA which it uses for this invention, what kind of thing may be used, for

でもよく、例えば、細菌の場合、プラスミドベクターDNA、バクテリオファージベクターDNAなどを挙げることができる。具体的には、例えば、プラスミド pBR322DNA [セスダ・リサーチ・ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories) 社製]、プラスミド pUC118DNA (宝酒造社製)、ファージλ cl<sub>857</sub> 1121 (特開昭 58-212781 号公報) などが好適である。

example, in the case of bacteria, it can mention the plasmid vector DNA, the bacteriophage vector DNA, etc.

Specifically, plasmid pBR322DNA [made by Bethesda Research Laboratories (Bethesda Research Laboratories) Co.] plasmid pUC118DNA (made by Takara-Shuzo Co.), phage (lambda)cl<sub>857</sub> 1121 (Unexamined-Japanese-Patent No. 58-212781 ), etc. are suitable, for example.

#### 【0019】

PTA、SATおよびOASLをそれぞれコードする遺伝子、すなわち p t a、c y s Eおよび c y s Kは、その構造、塩基配列も公知である (Z. Leish ら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 892-898 (1993) ; A. Matsuyama ら, Biochim. Biophys. Acta, 1219, 559-562 (1994)を参照のこと)。p t a 遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出される P T Aのアミノ酸配列を図1～3に、c y s E 遺伝子および c y s K 遺伝子の塩基配列をそれぞれ図4および図5に示す。それら遺伝子をベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の調製法は、上記文献に記載された方法に準じるか、通常の公知の方法を用い

#### [0019]

The structure and the base sequence of the gene which each codes PTA, SAT, and OASL, i.e., pta, cysE, and cysK are also public knowledge (Z. Leish et al., Appl. Environ. Microbiol., 59, 892-898 (1993);).

A. Refer to Matsuyama and others, Biochim. Biophys. Acta, 1219, 559-562 (1994).

The amino acid sequence of PTA drawn from the base sequence and this base sequence of a pta gene is shown in FIGS. 1-3, and the base sequence of a cysE gene and a cysK gene is each shown in FIG. 4 and FIG. 5.

According to the method described by the above-mentioned documents, it can perform the preparation method of the microorganisms which transformed these genes with the recombinant body DNA built into Vector DNA using the method of usual public knowledge.

For example, it is prepared in the following method and procedures.

て行うことができる。例えば、次のような方法および手順で調製される。

**【0020】**

まず、目的遺伝子が調製される。これには、例えば、次のような方法が用いられる。

1) 化学的合成法: この方法は、目的遺伝子の構造、およびその塩基配列が分っている大腸菌の場合に好適に用いることができる。公知の塩基配列に従って化学的に全合成し、クローニング用ベクター中にクローニングする。

**【0021】**

2) 公知の方法で、目的遺伝子のmRNAを調製し、それから目的のcDNAクローンを逆合成し、クローニング用ベクターにクローニングする。この方法は、かび、酵母などの真核生物に好適に用いられる。

3) 目的酵素を精製し、その酵素蛋白質の一部のアミノ酸配列を決定する。それに基づいて、目的遺伝子のオリゴDNAプライマーを化学合成する。そのプライマーを用いて、サザンブロッティング法により目的遺伝子を含むDNA断片混合物から目的遺伝子DNAを取り出す。それを鋳型として、PCR法により増幅させ、そのDNA断片を

**[0020]**

First, the objective gene is prepared.

The following method is used for this, for example.

1) Chemical synthesis method : it can use this method conveniently in the case of the Escherichia coli of which the structure of the objective gene and its base sequence are known.

According to the base sequence of public knowledge, it carries out a total synthesis chemically, it clones in the vector for a cloning.

**[0021]**

2) Prepare mRNA of the objective gene by the method of public knowledge, and it reverse-compounds the target cDNA clone, it clones to the vector for a cloning.

It gets moldy this method and it is used suitably for eucaryote, such as yeast.

3) Purify the objective enzyme, it decides some amino acid sequences of the enzyme protein.

Based on it, it chemo-synthesizes the oligo DNA primer of the objective gene.

It takes out the objective gene DNA from the DNA-fragment blend which contains the objective gene by the Southern-blotting method using the primer.

It makes it amplify by PCR method by making it into a casting mould.

It clones the DNA fragment in the vector for a cloning.

クローニング用ベクター中にクローニングする。そして、制限酵素により切断して目的遺伝子のDNA配列部分だけのものにする。前記DNA断片混合物は、染色体DNAの各種制限酵素による切断や物理的せん断などの公知方法で調製できる。この方法は原核生物について、好適に用いることができる。

**【0022】**

4) 目的遺伝子の構造、塩基配列が分っている場合に好適に用いられる方法であるが、N末端、C末端の塩基配列の一部を化学合成し、それらをプライマーとして、PCR法により、目的遺伝子DNA断片を含む染色体DNA（遺伝子供給源となる微生物から抽出精製した染色体DNA）断片混合物中、若しくは目的遺伝子DNAを保持する染色体DNA（遺伝子供給源となる微生物から抽出精製した染色体DNA）において、目的遺伝子だけを増幅させる。反応物をアガロース電気泳動し、増幅された目的遺伝子をゲル板から取り出し、クローニング用ベクターにクローニングする。この方法は、大腸菌の場合に好適に用いられる。

**【0023】**

上記1)～4)の方法により調

And a restriction enzyme cuts and it makes it only the DNA-sequence part of the objective gene.

It can prepare said DNA-fragment blend by the public knowledge method by the various restriction enzymes of Chromosome DNA, such as cutting and a physical shearing.

It can use this method conveniently about a prokaryote.

**[0022]**

4) When the structure of the objective gene and a base sequence are known, it is the method used suitably.

However, it chemo-synthesizes a part of base sequence of N terminal and a C terminal, in the chromosome DNA (the chromosome DNA extract and purified from the microorganisms used as a gene supply source) which maintains the objective gene DNA by PCR method by making them into a primer among the chromosome DNA (chromosome DNA extract and purified from microorganisms used as gene supply source) fragment blend containing the objective gene DNA fragment, it amplifies only the objective gene.

It carries out the agarose electrophoresis of the reaction material, it takes out the amplified objective gene from a gel board, it clones to the vector for a cloning.

This method is used suitably in the case of an Escherichia coli.

**[0023]**

It obtains each strain by transforming or

製された目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAを用いて、微生物、例えば前記エシェリヒア属に属する大腸菌株を形質転換あるいは形質導入してそれぞれの菌株を得る。この形質転換はディー・エム・モーリソン (D.M.Morrison) の方法 (Methods in Enzymology, 68, 326-331(1979) 参照) により行なうことができる。また形質導入はビー・ホーン (B.Hohn) の方法 (Methods in Enzymology, 68, 299-309 (1979) 参照) によって行なうことができる。

**【0024】**

各目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAにて形質転換あるいは形質導入した各菌株について、各目的遺伝子が目的の酵素、すなわち、SAT、PTAおよび／またはOASLを生産しているかどうかを確認するために各酵素の活性を測定する。それによって、目的の遺伝子がクローニングされたかどうかを確認される。

**【0025】**

また、最も一般的な方法であるが、目的遺伝子は、下記の方法によっても調製することができる。

5) 目的遺伝子を含有する染色体DNAから公知の方法でDN

transducing the Escherichia-coli strain which belongs to microorganisms, for example, said Escherichia genus, using the recombinant body vector DNA incorporating the objective gene prepared by the method of said 1)-4).

It can perform this transforming by the method (Methods in Enzymology, 68,326-331 (1979) refer to) of D.M.Morrison (D. M.Morrison).

Moreover, it can perform the transduction by the method (Methods in Enzymology, 68,299-309 (1979) refer to) of a bi-horn (B. Hohn).

**[0024]**

Each objective gene is the target enzyme at the recombinant body vector DNA incorporating each objective gene about transforming or each strain which carried out the transduction, that is, in order to check whether it produces SAT, PTA, and/or OASL, it measures the activity of each enzyme.

It is checked by it whether the target gene has been cloned.

**[0025]**

Moreover, it is the most general method.

However, it can prepare the objective gene also by the following method.

5) Prepare a DNA-fragment blend by the method of public knowledge from the chromosome DNA containing the objective

A断片混合物を調製する。これらのDNA断片をアトランダムに公知の方法でクローニング用ベクターにクローニングする。

**【0026】**

次いで、上記5)の方法により調製された目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAを用いて、微生物、例えば前記エッシェリヒア属に属する大腸菌株を形質転換あるいは形質導入してそれぞれの菌株を得る。そして、上記菌株からSAT、PTAおよび／またはOASL生産性を有する菌株を公知の方法によりスクリーニングすることにより、各遺伝子を含むDNAをベクターDNAに挿入した組換え体DNAを含み、SAT、PTAおよび／またはOASL生産性を有する大腸菌菌株を得ることができる。

**【0027】**

上記のスクリーニングとしては、例えば、形質転換された大腸菌株あるいは形質導入された大腸菌株を適宜な寒天培地にまいて、コロニーを形成させる。コロニーを適宜なメンブランに移しとり、メンブラン上で菌体を溶菌する。前記コロニーが溶菌されたメンブラン上で、溶菌コロニーと各酵素の一部のアミノ酸配列から化学合成されたオ

gene.

It clones these DNA fragments to the vector for a cloning by the method of public knowledge at random.

**[0026]**

Subsequently, it obtains each strain by transforming or transducing the Escherichia-coli strain which belongs to microorganisms, for example, said Escherichia genus, using the recombinant body vector DNA incorporating the objective gene prepared by the method of said 5).

And it can obtain the Escherichia-coli strain which has SAT, PTA, and/or OASL productivity including the recombinant body DNA which inserted DNA containing each gene in Vector DNA by screening by the method of public knowledge of the strain which has SAT, PTA, and/or OASL productivity from the above-mentioned strain.

**[0027]**

As the above-mentioned screening, it binds around the proper agar the transformed Escherichia-coli strain or the Escherichia-coli strain by which the transduction was carried out, for example, it forms a colony.

It moves a colony to a proper membrane and carries out the bacteriolysis of the microbial cell on a membrane.

On the membrane to which the bacteriolysis of said colony was carried out, it carries out the radiolabeling of the oligo DNA



リゴDNAを放射能標識するか、抗体を用いて酵素標識し、これらの標識化オリゴDNAとのハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションをしたコロニーを、適宜な培地に鈎上げて、培養する。

chemo-synthesized from some amino acid sequences of a bacteriolysis colony and each enzyme, or carries out an enzyme label using an antibody, it performs hybridization with these labeling oligoes DNA.

It lands the colony which was hybridized to a proper medium, and cultivates.

#### 【0028】

スグリーニングにより得られた菌株から純化された新規な組換え体DNAを得る方法としては、例えば、ピー・グーリー (P.Guerry) の方法 (J.Bacteriol., 116, 1064-1066 (1973) 参照)、デ・ビ・クレウエル (D.B.Cleweel) の方法 (J.Bacteriol., 110, 667-676 (1972) 参照) などが挙げられる。次いで、上記の純化された新規な組換え体DNAに、例えば、制限酵素 Sma I および Kpn I (いずれも宝酒造社製) を作用させて、DNA断片混合物を得る。上記DNA断片混合物より各種遺伝子を単離するには、ティ・マニアティス (T.Maniatis) の方法 (Molecular Cloning、173-178 頁、1982 年、Cold SpringHarbor Laboratory 出版) により得ることができる。

#### [0028]

As method of acquiring the new recombinant body DNA purified from the strain obtained by screening, the method (J. Bacteriol., 116,1064-1066 (1973) refer to) of P. Guerry and others (P. Guerry), the method (J. Bacteriol., 110,667-676 (1972) refer to) of D.B.Cleweel (D. B.Cleweel), etc. are mentioned, for example.

Subsequently, for example, it lets restriction enzymes Sma I and Kpn I (all are Takara-Shuzo company make) act on the purified above-mentioned new recombinant body DNA. It obtains a DNA-fragment blend.

In order to isolate various genes from the above-mentioned DNA-fragment blend, it can obtain by the method (Molecular Cloning, 173 - 178 pages, 1982, and Cold SpringHarbor Laboratory publication) of tee maniac teeths (T. Maniatis).

#### 【0029】

上記のようにして単離された目的の遺伝子 c y s E、p t a および c y s K、すなわち、S A

#### [0029]

It connects the proper promoter of public knowledge according to a host cell, for example, a rack (Lac) promoter, a trip (Trp)

T、PTAおよびOASLをコードするDNA配列に、公知の方法で、宿主細胞に応じた、公知の適宜なプロモーター、例えばラック(Lac)プロモーター、トリップ(Trp)プロモーター、あるいは制御配列などを連結する。勿論、cysE、pta、cysK自身のプロモーター、制御配列を好適に用いることができる。

**【0030】**

更に、宿主細胞に応じた、公知のターミネーター配列、或いは終止コドンUAA、UAG、UGAを公知の方法で連結する。また、cysE、pta、cysK自身の終止コドン、ターミネーター配列も好適に用いることができる。このようにして、SAT、OASLおよび/またはPTAを生産する組換え体DNAを調製することができる。

**【0031】**

なお、発現用ベクター自体に含有されるプロモーター、ターミネーターなどを好適に用いることもできる。得られたプロモーター等を連結したDNAをクローニング用ベクターに挿入ないし連結する。次いで、このクローニング用ベクターに組み込まれた目的遺伝子DNA断片を、適宜な制限酵素で該ベクターよ

promoter, or a control sequence with the DNA sequence which codes Genes cysE, pta, and cysK, i.e., SAT and PTA, and OASL to have isolated as mentioned above by the method of public knowledge.

Of course, it can use conveniently the promoter of cysE, pta, and cysK itself and a control sequence.

**[0030]**

Furthermore, it connects by the terminator sequence of public knowledge according to a host cell, or the method of public knowledge of termination codon UAA, UAG, and UGA.

Moreover, it can also use conveniently the termination codon of cysE, pta, and cysK itself, and a terminator sequence.

Thus, it can prepare the recombinant body DNA which produces SAT, OASL, and/or PTA.

**[0031]**

In addition, it can also use conveniently a promoter, a terminator, etc. which it contains in the expression vector itself.

It inserts or connects DNA which connected the obtained promoter with the vector for a cloning. Subsequently, it cuts out the objective gene DNA fragment integrated in this vector for a cloning from this vector by a proper restriction enzyme, it inserts or connects with the usual expression vector of public knowledge, a

り切り出して、公知の通常の発現用ベクターに挿入ないし連結して、組換え体発現ベクターが調製される。公知の発現ベクターとしては、すなわち、プラスミドベクターとしては、例えば、pBR322、ファージベクターとしては、例えば、 $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1 1 2 1 (特開昭 58-212781 号公報) など挙げることができる。

### 【0032】

この場合、ベクターにSAT、PTAおよびOASLから選ばれる1種の酵素をコードするDNAを組み込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできる。また、同一ベクターにSAT、PTAおよびOASLから選ばれる2種をそれぞれコードするDNA 2種を組み込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできるし、同一ベクターにSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードするDNA 3種を組み込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできる。これは、前記D. Leishらの方法、松山らの方法(特開平 1-228473 号公報)により達成できる。例えば、遺伝子DNA或いはプロモーターDNA領域の両外側に新たに制限酵素切断部位を作製することにより、同一ベクターに2種以上の遺伝子DNAをそれぞれ1個以上挿入することが

recombinant body expression vector is prepared.

As the expression vector of public knowledge, i.e., a plasmid vector, it can mention (lambda)cl<sub>857</sub> 1121 (Unexamined-Japanese-Patent No. 58-212781) etc., for example as pBR322 and a phage vector, for example.

### [0032]

In this case, it can also prepare the recombinant body expression vector incorporating DNA which codes one sort of enzymes chosen as a vector from SAT, PTA, and OASL.

Moreover, it can also prepare the recombinant body expression vector incorporating two sorts of DNA which each codes two sorts chosen as the same vector from SAT, PTA, and OASL.

It can also prepare the recombinant body expression vector which integrated three sorts of DNA which each codes SAT, PTA, and OASL in the same vector.

It can attain this by the method of said D. Leish and others, and the method (Unexamined-Japanese-Patent No. 1-228473) of Matsuyama and others.

For example, it can each carry out one or more insertion of the 2 or more types of gene DNA at the same vector by newly producing a restriction enzyme cleavage site on both the outer sides of Gene DNA or the promoter DNA region.

できる。

**【0033】**

また、SATは、合成されたL-含硫アミノ酸によりフィードバック阻害を受けるので、L-含硫アミノ酸によるフィードバック阻害を受けないようにSATをコードする遺伝子cysEを処理することが、本発明においては極めて好適である。それには、Mutan<sup>tm</sup>-K（宝酒造社製）キットなどが一般的に用いられる。具体的にはD.Denkらの方法（J. Gen. Microbiol., 133, 515-525 (1987)）に従って、一塩基置換などを行えばよい。また、亜硝酸、ギ酸、ヒドラジン等の処理すること〔新基礎生化学実験講座7、遺伝子工学、丸善（株）出版、90頁、1988年〕、微生物自体のSAT活性がこのような阻害を受けにくくなった変異株より取り出した遺伝子cysEを用いることなどによっても好適に達成できる。

**【0034】**

前記のようにして調製された、目的遺伝子を組込んだ組換え体発現ベクターを用いて、各種微生物を形質転換あるいは形質導入して形質転換体を得る。この場合、前記の目的遺伝子クローニングに用いた形質転換法あるいは形質導入法をそのまま用い

**[0033]**

Moreover, SAT receives a feedback inhibition with compounded L- sulfur containing amino acid, depend.

It is very suitable in this invention to treat the gene cysE which codes SAT so that the feedback inhibition by L- sulfur containing amino acid may not be received.

Generally a Mutan<sup>tm</sup>-K (made by Takara-Shuzo company) kit etc. is used for it.

What is sufficient is just to perform a little salt group substitution etc. according to the method (J.Gen.Microbiol., 133,515-525 (1987)) of D.Denk and others specifically.

Moreover, things to treat, such as nitrous acid, a formic acid, and a hydrazine, it can attain suitably by using the gene cysE which the SAT activity of the microorganisms itself took out from the mutant which stopped receiving such an obstruction in [the new basic biochemistry experiment seminar 7, genetic engineering, the Maruzen Co., Ltd. publication, 90 pages, and 1988] etc.

**[0034]**

It obtains a transformed body by transforming or transducing various microorganisms using the recombinant body expression vector incorporating the objective gene prepared as mentioned above.

In this case, it can use the transforming method or transduction method used for the above-mentioned objective gene cloning as it is.

ることができる。なお、遺伝子の供給源となる微生物からの染色体DNAの抽出は、通常の方法で行うことができる。

目的酵素の活性を有する微生物の培養菌体をリゾチームおよび界面活性剤で処理して、溶菌する。これについて、除蛋白処理を施す。次いで、エタノールで沈殿させる齊藤、三浦の方法

(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) により単離できる。

#### 【0035】

上記の組換え体DNAにより形質転換される宿主は特に限定されないが、よく用いられるものとして、例えば、エッシェリヒア属に属する大腸菌を挙げることができる。具体的には、大腸菌K-12、好ましくは、HB101 (ATCC33694)、DHI (ATCC33489)、x-1776 (ATCC31244)、1100 [Max-Plank-Institut (ハイデルベルグ) より入手]、JM101 (ATCC33876)等を挙げることができる。

#### 【0036】

本発明で用いる形質転換された微生物は、前記したように、SAT、PTAおよびOASLの中の少なくとも一つの酵素をコ

In addition, it can perform extraction of the chromosome DNA from the microorganisms used as the supply source of a gene by the method of usual public knowledge.

It treats the culture microbial cell of microorganisms which has the activity of the objective enzyme with lysozyme and a surface active agent, it carries out the bacteriolysis.

About this, it performs deproteinization treatment.

Subsequently, it can isolate by the method (Biochim. Biophys. Acta, 72, and 619 (1963)) of Saito who lets it precipitate by ethanol, and a Miura.

#### [0035]

Although the host in particular transformed with the above-mentioned recombinant body DNA is not limited, it can mention the Escherichia coli belonging to an Escherichia genus as what is used well, for example.

Specifically, it is Escherichia coli K-12, preferably, it can mention acquisition], JM101 (ATCC33876), etc. from HB101 (ATCC33694), DHI (ATCC33489), x-1776 (ATCC31244), and 1100 [Max-Plank-Institut (Heidelberg).

#### [0036]

As the transformed microorganisms which it uses by this invention were above-mentioned, DNA which codes at least 1 enzyme in SAT, PTA, and OASL should just be integrated.

ードするDNAが組み込まれたものであればよいが、使用する微生物の種類を減らすことができるという観点から、上記酵素の中の二つ以上の酵素をそれぞれコードするDNAが組み込まれたものを使用するのが好ましく、更に上記三つの酵素をそれぞれコードするDNAが組み込まれたものを使用するのが好ましい。尚、一つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは、(E)、(F) および(G) 成分であり、二つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは、(H)、(I) および(J) 成分であり、三つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは(K) 成分である。

#### 【0037】

上記のSAT、PTAおよび／またはOASL生産性を有する微生物の培養は、通常の微生物の培養に通常用いられる合成ないし天然培地を用いて行なうことができる。そして、その成分は、例えば、次のようなものを用いられる。

(1) 炭素源：ブドウ糖、果糖、蔗糖、マルトース、粗糖類、糖密類（例えば、甜菜糖密、甘藷糖密）、各種澱粉類（例えば、タピオカ、サゴヤシ、甘藷、馬鈴薯、トウモロコシ）またはその酸糖化液類、酵素糖化液類。

However, it is desirable to use that in which DNA which each codes the 2 or more enzyme in the above-mentioned enzyme was integrated from a viewpoint that it can reduce the kind of microorganisms to be used, and it is desirable to use that in which DNA which each codes the three above-mentioned enzymes further was integrated.

In addition, the thing in which DNA which codes one enzyme was integrated, (E), (F)

It reaches.

(G) It is the component.

That in which DNA which codes two enzymes was integrated, (H), (I)

It reaches.

(J) It is the component.

That in which DNA which codes three enzymes was integrated is (K). It is the component.

#### [0037]

It can perform a culture of the microorganisms which have SAT, above-mentioned PTA, and/or above-mentioned OASL productivity using the composition or the natural medium usually used for a culture of the usual microorganisms.

And the component has the following used for example.

(1) source of carbon: glucose, fructose, cane sugar, the maltose, raw sugars, molasses (for example, a beet-sugar dense, a sweet-potato molasses), various starches (for example, tapioca, a sago palm, a sweet potato, a potato, corn), or the acid of those saccharization liquid and an enzyme saccharization liquid

## 【0038】

(2) 窒素源：ペプトン、大豆粉、コーンステープリカー、酵母エキス、肉エキス、大豆そのものまたは脱脂大豆またはそれらの粉体または粒体またはそれらの抽出液、尿素などの有機窒素源類、また硫酸、硝酸、塩酸、炭酸などのアンモニウム塩類、アンモニアガス、アンモニア水などの無機窒素源類。

(3) その他：菌の生育に必要な各種無機塩類、例えば、カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛などの硫酸塩類、塩酸塩類、リン酸塩類、酢酸塩類。また、アミノ酸類、ビタミン類。アミノ酸類としては、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジンなど、ビタミン類としてはビオチン、サイアミンなどを挙げることができる。

## 【0039】

これらの成分もしくは素材が適当に選択され、単独または組合せて、かつSAT、PTAおよびOASLの生産ができるように、それらを含むせしめて、無機もしくは有機合成培地または天然培地の液体培地が製造される。その際、培地のpHは、5～9、好ましくは6～8に苛性

## [0038]

(2) The source of nitrogen : sources of inorganic nitrogen, such as ammonium salts, such as sources of organic nitrogen, such as the peptone, soybean meal, corn steep liquor, a yeast extract, a meat extract, the soybean itself, defatted soybeans, those fine particles, grains or those extracts, and urea, and a sulfuric acid, nitric acid, hydrochloric acid, and carbonic acid, ammonia gas, and ammonia water

(3) Others : sulfates, such as various inorganic salt required for growth of a microbe, for example, calcium, potassium, sodium, magnesium, manganese, iron, copper, and zinc, hydrochloride, phosphates, acetic-acid salts.

Moreover, amino acids and vitamins.

As amino acids, glutamic acid, the aspartic acid, an alanine, a leucine, the phenylalanine, the histidine, etc. can mention a biotin, a thiamin, etc. as vitamins.

## [0039]

These component or raw materials are chosen suitably, individually or in combination and it contains them and inorganic, an organic-synthesis medium, or the broth of a natural medium is manufactured so that production of SAT, PTA, and OASL can be performed.

PH of a medium is 5-9 in that case, preferably it adjusts to 6-8 with caustic soda, a caustic

ソーダ、苛性カリ、アンモニアなどで調整される。培地の殺菌は、通常の方法、例えば、110～140℃で8～15分間加熱して行なえばよい。

**【0040】**

培養は、振とう培養、通気攪拌培養などの好氣的条件下で行なう。培養温度は25～45℃、好ましくは30～40℃が適当である。培養時のpHは5～9、好ましくは6～8が適当である。pHの調節は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、またはそれらの水溶液によって行なう。培養期間は通常2～7日間である。

**【0041】**

このようにして得られた培養物あるいは培養物から遠心分離、または限外濾過、若しくは通常の濾過など操作により得られた生菌体、その乾燥菌体、生菌体を自己消化、各種磨砕あるいは各種音波処理などを施すことにより得られる菌体処理物、およびこれらの菌体の抽出物より得られる酵素含有物が、SAT、PTAおよびOASLの酵素源として用いられる。また、上記菌体もしくは酵素含有物を固定化した菌体処理物なども好適な酵素源として用いることができる。

potash, ammonia, etc.

What is necessary is to heat sterilization of a medium for 8 to 15 minutes, and just to perform it by the usual method, for example, 110-140 (degree C).

**[0040]**

It performs a culture under aerobic condition of the shake culture, aeration-rotation culture, etc. Culture temperature is 25 - 45 degrees C, preferably 30 - 40 degrees C is suitable.

PH at the time of a culture is 5-9, preferably 6-8 is suitable.

The sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia, or those aqueous solutions perform regulation of pH.

A culture period is between usually 2-7 days.

**[0041]**

Thus, the oxygen containing thing obtained from the microbial-cell processed material obtained by giving autolysis, various fragmenting, or various sonications and the extract of these microbial cells in the living microbe body obtained from the obtained culture or the culture by operations, such as a centrifugation, extra filtering, or the usual filtering, its drying microbial cell, and a living microbe body is used as a source of an enzyme of SAT, PTA, and OASL.

Moreover, it can use the microbial-cell processed material which immobilized the above-mentioned microbial cell or the oxygen containing thing as a suitable source of an enzyme.



## 【0042】

尚、上記菌体の処理物からSAT、OASL、PTAを分離精製することも可能である。これらの酵素を分離精製するには、通常のこれら酵素の分離精製法が適用される（酵素ハンドブック、238頁、246頁、710頁；朝倉書店出版、1982年；丸尾文治、田宮信雄監修）。すなわち、プロタミン処理、エタノール分画、硫酸分画、カルシウムアパタイト処理もしくはそれによるクロマトグラフィー、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、DEAE-セハデックスクロマトグラフィー、QAE-セルロースクロマトグラフィー、QAE-セハデックスクロマトグラフィー、セハデックスG-200、100、もしくは50などまたはセファロース6Bによるゲル濾過クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲルなどを用いる電気泳動、各種充填材によるHPLCなど、またはそれらの適宜な組合せにより分離精製される。

## 【0043】

また、上記のように組換え体DNAにより形質転換した微生物は、SAT、OASLおよび／またはPTA生産能が高い、即ち、菌体蛋白質1mgあたりの

## [0042]

In addition, it can also separate-and-refine SAT, OASL, and PTA from the processed material of the above-mentioned microbial cell.

In order to separate-and-refine these enzymes, the method of separate-and-refining the usual these enzyme are applied (an enzyme handbook and 238 page, page 246 and page 710; Asakura Publishing Company publication, 1982; Maruo Bunji, Tamiya Nobuo editorial supervision).

Namely, protamine treatment, the ethanol fraction, an ammonium sulfate fractionation, calcium apatite treatment, or the chromatography by it, a DEAE-cellulose chromatography, a DEAE-Sephadex chromatography, a QAE-cellulose chromatography, a QAE-Sephadex chromatography, Sephadex G-HPLC etc. by the electrophoresis and the various filling materials using 200, 100, 50 etc. or the gel filtering chromatography by Sepharose 6B, polyacrylamide gel, etc. or those proper combination separate-and-refine.

## [0043]

Moreover, the microorganisms transformed with the recombinant body DNA as mentioned above have SAT, OASL, and/or a high PTA producing ability, that is, it can use processed material, such as a microbial cell or fragmenting, and

SAT、OASLおよび／またはPTA活性が高いことから、上記のように微生物菌体から酵素を分離精製することなく、菌体または磨砕、破壊などの処理物をそのまま酵素源として用いることができる。具体的には、SATをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のSAT活性は、菌体蛋白質1mg当たり0.1～30Uである。また、OASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のOASLの活性は菌体蛋白質1mg当たり2～300Uである。更に、PTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のPTAの活性は菌体蛋白質1mg当たり5～300Uである。

**【0044】**

尚、SAT活性が0.1U/mg未満の場合は、菌体自体のL-含硫アミノ酸の分解系の酵素活性が強くなるために、菌体および／またはその処理物をそのまま酵素源として用いることはできない。OASL活性が2U/mg未満、PTA活性が5U/mg未満の場合も同様である。またSAT活性が30U/mgを超える微生物菌体を調製するこ

struction, as a source of an enzyme as they are from SAT, OASL, and/or PTA activity per 1 mg of microbial-cell proteins being high, without separate-and-refining an enzyme from a microorganism cell as mentioned above.

The SAT activity of the microorganisms transformed with the recombinant body DNA which integrated specifically DNA which codes SAT in Vector DNA is per 1 mg of microbial-cell proteins. It is 0.1-30U.

Moreover, the activity of OASL of the microorganisms which transformed DNA which codes OASL with the recombinant body DNA built into Vector DNA is 2-300 U per 1 mg of microbial-cell proteins.

Furthermore, the activity of PTA of the microorganisms which transformed DNA which codes PTA with the recombinant body DNA built into Vector DNA is 5-300 U per 1 mg of microbial-cell proteins.

**[0044]**

In addition, SAT activity Since the enzyme activity of the degradation type of L- sulfur containing amino acid of the microbial cell itself becomes strong when it is less than 0.1 U/mg, it cannot use a microbial cell and/or substance obtained by treating it as a source of an enzyme as it is.

It is also similar as when OASL activity is less than 2 U/mg and PTA activity is less than 5 U/mg.

Moreover, SAT activity is difficult for preparing

とは現在むずかしい。OASL  
 が 300U/mg を超える場合、  
 PTA活性が 300U/mg を超  
 える場合も同様である。

the microorganism cell exceeding 30 U/mg now.  
 OASL When exceeding 300 U/mg, PTA  
 activity It is also similar as when exceeding  
 300 U/mg.

**【 0 0 4 5 】**
L-含硫アミノ酸の製造法

(A) ～(D) 成分と、(E) ～(G) 成  
 分とを反応させるか、(A) ～(D)  
 成分と、(F')成分および(H) 成分  
 とを反応させるか、(A) ～(D)  
 成分と、(E')成分および(I) 成分  
 とを反応させるか、(A) ～(D)  
 成分と、(G')成分および(J) 成分  
 とを反応させるか、(A) ～(D)  
 成分と、(K) 成分とを反応させ  
 ることにより、L-含硫アミノ  
 酸を生成させることができる。

**[0045]**

The production of L- sulfur containing amino  
 acid

By letting (A)-(D) component and (E)-(G)  
 component react, or

letting (A)-(D) component and (F') component  
 and (H) component react, or

letting (A)-(D) Component and (E') component  
 and (I) component react, or

letting (A)-(D) component and (G') component  
 and (J) component react, or

letting (A)-(D) component and (K) component  
 react, it can form L- sulfur containing amino  
 acid.

**【 0 0 4 6 】**

この場合、反応は適宜な緩衝液  
 中で行うが、(A) ～(D) 成分は  
 予め緩衝液に混合した後に、微  
 生物の菌体および／またはその  
 処理物と混合するのが好まし  
 い。上記の混合において、混合  
 する各種成分の濃度には特に制  
 限はないが、一般的には、(A) 成  
 分のL-セリンは 50～150 m  
 M、好ましくは 60～130 mM、  
 (B) 成分の硫化物は 10～50m  
 M、好ましくは 20～32mM、(C)  
 成分のアセチルCoAは 0.1～  
 1 mM、好ましくは 0.3～0.5  
 mM、(D) 成分のアセチルリン

**[0046]**

In this case, it performs reaction in proper  
 buffer.

However

(A) -(D) After mixing the component in buffer  
 beforehand, it is desirable to mix with the  
 microbial cell of microorganisms and/or  
 substance obtained by treating it.

In the above-mentioned mixing, although there  
 is no limitation in particular in concentration of  
 the various component to mix, generally L-  
 serine of (A) component is 50-150 mM,  
 preferably 60-130 mM, the sulfide of (B)  
 component is 10 to 50 mM, preferably 20 to 32  
 mM, the acetyl CoA of (C) component is 0.1 to 1  
 mM, preferably 0.3-0.5 mM and the acetyl

酸 5～30mM、好ましくは 10～30mMである。

phosphate of the (D) component is 5 to 30 mM of, preferably 10 to 30 mM.

**【 0 0 4 7 】**

微生物の菌体および／またはその処理物の添加量は菌体の処理方法により異なるが特に制限がなく、基質の濃度、前記三つの酵素の活性、その他の種々の条件により適宜変更できる。この反応の場合、反応液中のSATの活性を、0.01～30U（以下Uは国際単位とする）、好ましくは0.03～30U、特に好ましくは0.1～30U、OASLの活性を1～300 U、好ましくは3～300 U、特に好ましくは5～300 U、PTAの活性を0.5～300 U、好ましくは1～300 U、特に好ましくは5～300 Uになるように微生物の菌体および／またはその処理物を反応液に存在させることが、L-含硫アミノ酸の反応収率を上げるのによい。すなわち、アセチルCoA再生系を強化することにより、高価な原料であるアセチルCoAを低濃度にして、L-含硫アミノ酸の反応収率を上げることができる。

**【 0 0 4 8 】**

この場合、反応液中のSAT活性が0.01U未満の場合は、該活性が反応生成物であるL-含硫アミノ酸による阻害すなわちフ

**[0047]**

Particularly although the microbial cell of microorganisms and/or the additional amount of substance obtained by treating it change with processing methods of a microbial cell, they do not have limitation, and it can alter them suitably according to concentration of a matrix, active of said three enzymes, and other various conditions.

In the case of this reaction, it is 0.01-30U (Following U is taken as an international unit) about the activity of SAT in a reaction mixture, preferably it is 0.03-30U, most preferably It is 1-300 U about the activity of 0.1-30U and OASL, preferably it is 3-300 U, most preferably, it is the activity of 5-300 U and PTA. 0.5-300 U, preferably it is 1-300 U, it is good for raising the reaction yield of L- sulfur containing amino acid to let the microbial cell and/or substance obtained by treating it of microorganisms exist in a reaction mixture so that it may be set to 5-300 U most preferably.

That is, it makes into low concentration the acetyl CoA which is an expensive raw material by reinforcing an acetyl-CoA regenerating system, it can raise the reaction yield of L-sulfur containing amino acid.

**[0048]**

In this case, when the SAT activity in a reaction mixture is under 0.01U, this activity comes to receive, the obstruction, i.e., the feedback inhibition, by L- sulfur containing amino acid

ィードバック阻害を受けるようになり、L-含硫アミノ酸の反応収率が低下する。OASL活性が1U未満の場合は、O-アセチル-L-セリンが反応液中に生成蓄積するがL-含硫アミノ酸の生成蓄積量はすくなくなる。PTA活性が0.5U未満の場合は、アセチルCoAの生成量が少なくなつたので、上記原料の他にアセチルCoAを多量添加しないと反応が円滑に進行しなくなる。また、SAT活性が30Uを超える場合は、反応に必要なとする以上の量であるので、L-含硫アミノ酸の生産コストが上昇するので、好ましくない。OASL活性が300Uを超える場合、PTA活性が300Uを超える場合も同様である。

#### 【0049】

本発明の方法において、生菌体、または乾燥菌体自体を酵素源として用いる場合、各種界面活性剤または各種有機溶剤を反応液中に添加することにより、より収率よく生成物を得ることができる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウムブロマイドなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド

which is a reaction product, the reaction yield of L- sulfur containing amino acid falls.

When OASL activity is under 1U, although O-acetyl- L- serine produce-accumulates in a reaction mixture, the amount of production\_and\_accumulation of L- sulfur containing amino acid becomes empty, it is lost. PTA activity Since there is little produced amount of the acetyl CoA when it is under 0.5U, unless it carries out abundant adding of the acetyl CoA other than the above-mentioned raw material, reaction will not advance smoothly. Moreover, when SAT activity exceeds 30U, it is the above quantity which it needs for reaction, depend.

The production cost of L- sulfur containing amino acid raises, depend.

It is not desirable.

OASL activity When exceeding 300U, PTA activity It is also similar as when exceeding 300U.

#### [0049]

In the method of this invention, when using a living microbe body or the drying microbial cell itself as a source of an enzyme, it can obtain a product with a more sufficient yield by adding various surface active agents or various organic solvents into a reaction mixture.

As a surface active agent, if formation of L- sulfur containing amino acids, such as non-ion surfactants, such as anionic surface active agents, such as cationic surface active agents, such as a polyoxyethylene stearyl amine (for example, Nymeen S-215, made by NOF-Corp.) and a cetyl trimethyl-ammonium bromide, and a

硫酸などのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート（例えば、ノニオンST221、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤などL-含硫アミノ酸の生成を促進するものならば、いずれでも使用できる。これらは通常、反応液1 ml 当たり1～50mg、好ましくは1～20mgの濃度で用いられる。

#### 【0050】

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、アセトン、脂肪族アルコール、ベンゼンあるいは酢酸エチルなどを用いることができる。これらは、通常、反応液1 ml 当たり、0.1～50  $\mu$  l、好ましくは1～20  $\mu$  l の濃度で用いられる。反応温度は、通常10～60℃、好ましくは20～50℃、特に好ましくは36～48℃であり、pHは通常5～9、好ましくは6～8.5である。また、反応は、通常、1～80時間で完了する。

#### 【0051】

反応液からのL-含硫アミノ酸、すなわちL-システインおよび/またはL-シスチンの分離精製は、通常の酵素反応液、発酵液からのアミノ酸の精製に用いられる方法を用いて行なうことができる。たとえば、反応

sodium oleyl amidosulfuric acid, and a polyoxyethylene sorbitan mono-stearate (for example, a nonion ST221, made by NOF-Corp.), is promoted, it can use either. These are usually 1 - 50 mg per 1 ml of reaction mixtures, preferably it is used by concentration of 1 - 20 mg.

#### [0050]

As an organic solvent, it can use toluene, a xylene, acetone, an aliphatic alcohol, benzene, or ethyl acetate.

These are usually per 1 ml of reaction mixtures, and 0.1-50 microliter, preferably it is used by concentration of 1-20 microliter.

Reaction temperature is usually 10 - 60 degrees C, preferably it is 20 - 50 degrees C, most preferably, it is 36 - 48 degrees C.

PH is usually 5-9, preferably it is 6-8.5.

Moreover, it usually finalizes reaction in 1 to 80 hours.

#### [0051]

It can perform a separation and refinement of L-sulfur containing amino acid from a reaction mixture, i.e., L- cystein, and L- cystine using the method used for purification of the amino acid from usual enzyme-reaction liquid and a fermented liquor.

For example, if gas-passage is performed to a

終了後に反応液に通気を行なえば、L-システインは酸化されてL-シスチンとなって沈殿するので容易に単離できる。このようにして得られるL-シスチンは電気分解などによる還元により容易にL-システインとなる。

reaction mixture after the reaction completion, L- cystein oxidizes, and since it constitutes L- cystine and precipitates, it can isolate it easily. Thus, L- cystine obtained constitutes L- cystein easily by reduction by electrolysis etc.

## 【 0 0 5 2 】

## [0052]

## 【実施例】

## [EXAMPLES]

以下本発明を実施例をもって説明する。本発明においては、L-含硫アミノ酸、すなわちL-システインおよびL-シスチンの定量法、SAT、OASL、PTAの活性測定法は以下のとおりである。

It demonstrates this invention with an Example below.

In this invention, the activity-measurement method of the assay method of L- sulfur containing amino acid, i.e., L- cystein, and L- cystine, SAT, OASL, and PTA is as follows.

## 【 0 0 5 3 】

## [0053]

〔L-含硫アミノ酸の定量法〕  
L-システインおよびL-シスチンを、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で定量した。本発明ではL-システインとL-シスチンの合計量を本発明の酵素反応により生成したL-含硫アミノ酸量とした。

[The assay method of L- sulfur containing amino acid]

It assayed L- cystein and L- cystine by HPLC (high performance liquid chromatography).

It considered it as L- cystein and L- sulfur-containing amino acid amount which formed the total amount of L- cystine by the enzyme reaction of this invention in this invention.

## 【 0 0 5 4 】

## [0054]

HPLCによる定量は、NBD-  
F  
(7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)を用いたHPLC

It performed the assay by HPLC based on the HPLC-fluorescence method (Y. Watanabe, KImai, J.Chromatofr., 239,723 (1982)) for having used NBD-F

ー蛍光法 (Y.Watanabe, K.Imai, (7-fluoro-4-nitorobenzo-2-oxa-1,3-diazole).  
 J.Chromatofr., 239,723(1982)) It dilutes a reaction mixture 40 times, it added  
 をもとに行った。反応液を40 100 microliter to 10-mM sodium-phosphate  
 倍に希釈し、その100  $\mu$ l を buffer (pH8.0) 700 microliter.  
 10 mMリン酸ナトリウム緩衝 It added acetonitrile solution 100 microliter of 10  
 液 (pH 8.0) 700  $\mu$ l に mMNBDF to this, and carried out the  
 加えた。これに10 mMNBDF fluorescent labelling of the amino acid by  
 -Fのアセトニトリル溶液10 heating for 4 minutes at 60 degrees C under a  
 0  $\mu$ l を加え、遮光下60°Cで shading.  
 4分間加熱することによってア It cools in ice for 30 seconds, it added 1N  
 ミノ酸を蛍光ラベル化した。3 hydrochloric acid 100 microliter, and stopped  
 0秒間氷冷し、1N塩酸を10 reaction.  
 0  $\mu$ l 加えて反応を停止した。 It injects product 20 microliter into a HPLC  
 生成物20  $\mu$ l をHPLCカラ column, it conducted the analysis on the  
 ムに注入し、下記条件にて分析 following conditions.  
 を行った。即ち、カラムは That is, a column uses 125A10 micrometer  
 Waters社製  $\mu$ BONDAPAK C18 (3.9\*150 mm) of micronBONDAPAK C18 by  
 125A10  $\mu$ m (3.9 $\times$ 150mm)を Waters at room temperature, and it is Eluent A  
 室温で用い、溶出液A (50mM (50 mM  
 酢酸アンモニウムーアセトニト ammonium-acetate-acetonitrile-methanol  
 リルーメタノール (80:10:10、 (80:10:10, v/v)). It is the flow velocity about  
 v/v)) を 5.5 分、次に溶出液B Eluent B (50 mM  
 (50mM 酢酸アンモニウムー ammonium-acetate-acetonitrile-methanol  
 アセトニトリルーメタノール (30:30:40, v/v)) to 5.5 minutes and the next.  
 (30:30:40, v/v)) を流速 It used by 0.8 ml/min.  
 0.8ml/min で用いた。検出は蛍 It performed detection by (lambda)ext470 nm  
 光検出器 (HITACHIF-1000 and (lambda)em 540 nm using the fluorescence  
 Fluorophotometer) を用いて  $\lambda$  detector (HITACHIF-1000 Fluorophotometer).  
 ext470nm、 $\lambda$  em 540nmで行 The holding time in this condition is cystine 22  
 った。この条件下での保持時間は minutes for cystein 19 minutes.  
 システイン 19 分、シスチン 22 It computed each amino acid from the analytical  
 分であり、各アミノ酸は標準品 curve acquired from the stock item.  
 から得た検量線より算出した。

【0055】

[SAT 活性]

[0055]

[SAT active]



試薬1 : 10 mM トリス塩酸  
(pH 7.6) (1 mM  
Na<sub>2</sub>EDTA 含有)、1 mM L-  
セリン、および0.1 mM ア  
セチルCoAを含有する。試験  
管(1×8 cm)に試薬1を1.  
95 mlとり、適宜に希釈した酵  
素液を0.05 ml加えて、1分  
間当りの232 nmでの吸光度  
の減少(アセチルCoAの消費  
量)を測定する。次式により酵  
素活性を算出する。

$(\Delta OD / 4.2) \times 40 = \text{酵}$   
素液1 ml当りの活性 (U/ml)

It contains the tris hydrochloric acid (pH7.6) (1  
mM Na<sub>2</sub>EDTA content), 1 mM L- serine, and the  
0.1 mM acetyl CoA 1:10 mM of reagent.

It takes 1.95 ml of reagent 1 at a test tube (1\*8  
cm), and measures absorbance (0.05 ml, in  
addition 232 nm per for 1 minute) of a reduction  
(consumption of the acetyl CoA) for the enzyme  
liquid diluted suitably.

It computes an enzyme activity by following  
Formula.

Per 1 ml of (TRIANGLEOD/4.2) \*40= enzyme  
liquid is active (U/ml).

#### 【0056】

[OASL活性]

試薬2 : 160 mM トリス塩  
酸、100 mM O-アセチル  
-L-セリン、3.2 mM 硫  
化ナトリウム、0.8 mM  
EDTA および0.2 mM ピリ  
ドキサルリン酸を含む溶液  
(pH 7.2~7.3)

試薬3 : 1 mM 亜硝酸溶液  
(0.1 M NaNO<sub>2</sub> / 0.4 N  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 v / 99 v)

#### [0056]

[OASL active]

2:160 mM of reagent The tris hydrochloric acid,  
100 mM O- acetyl- L- serine, 3.2 mM  
Sodium sulfide, 0.8 mM EDTA, and solution  
containing 0.2 mM of pyridoxal phosphoric acid  
(pH7.2-7.3)

3:1 mM of reagent Nitrous-acid solution  
(0.1M NaNO<sub>2</sub>/0.4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1v/99v)

#### 【0057】

試薬4 : 2%スルファミン酸ナ  
トリウム溶液

試薬5 : 塩化水銀溶液(下記の  
A、B、C溶液を1:4:2 (v  
/v)の割合で混合した)

A : 2%塩化水銀溶液(0.4  
N 塩酸で調製)

#### [0057]

4:2% sulfamic-acid sodium solution of reagent

Reagent 5: Mercury chloride solution (it mixed  
the following A, B, and C solution at ratio of  
1:4:2 (v/v))

A:2% mercury chloride solution (it prepares with  
the 0.4N hydrochloric acid)

B:6.88% sulfamic-acid amido solution (it

B : 6.88%スルファミン酸 アミド溶液 (0.4N 塩酸で調製) prepares with the 0.4N hydrochloric acid)

C : 0.2% N-1-ナフチル-エチレンジアミン無水塩酸塩 溶液 (0.4N 塩酸で調製) C:0.2% N-1-naphthyl-ethylenediamine anhydrous-hydrogen-chloride salt solution (it prepares with the 0.4N hydrochloric acid)

**【0058】**

試験管 (1×8 cm) に試薬2を190 μlとり、次に適宜に希釈した酵素液10 μl加えて4分間酵素反応を行う。試薬3を1 ml加えて反応を停止させ、6分後、試薬4を0.1 ml加え、2分間攪拌する。試薬5を1.6 ml加え、6～10分後、発色した色を540 nmで比色定量する。次式に活性を算出する。

$(\Delta OD / 4 / 0.27 / 10) \times 20 \times \text{希釈率} = \text{酵素液 1 ml 当りの活性 (U/ml)}$

**[0058]**

It takes reagent 2 190 microliter in the test tube (1\*8 cm), and then adds diluted enzyme liquid 10 microliter suitably and performs an enzyme reaction for 4 minutes.

It adds 1 ml of reagent 3, and stops reaction. In 6 minutes, it adds 0.1 ml of reagent 4, and agitates it for 2 minutes.

It adds 1.6 ml of reagent 5, and carries out the colorimetry of the color developed colors by 540 nm in 6-10 minutes.

It computes activity in following Formula.

$\text{TRIANGLEOD} / 4 / 0.27 / (10) * 20 * \text{dilution ratio} = \text{per 1 ml of enzyme liquid is active (U/ml).}$

**【0059】**

[PTA活性]

試薬6 : 100 mM トリス塩酸 (pH8.0)、5 mM 塩化マグネシウム、0.5 mM NAD、0.5 mM CoA、5 mM L-リンゴ酸、12.5 μg/ml リンゴ酸脱水素酵素、25 μg/ml クエン酸合成酵素 (citrate synthase)。

**[0059]**

[PTA active]

6:100 mM of reagent The tris hydrochloric acid (pH8.0), 5 mM The magnesium chloride, 0.5 mM NAD, 0.5 mM CoA, 5 mM L- malic acid, 12.5 microgram/ml malate dehydrogenase, 25 microgram/ml citrate synthetase (citrate synthase).

**【0060】**

試薬7 : 100 mM アセチル

**[0060]**

Reagent 7:100 mM acetyl phosphate solution.

リン酸溶液。  
 試験管 (1 × 8 cm) に試薬 6  
 を 2.7 ml とり、適宜に希釈し  
 た酵素液 0.1 ml を加え、次に  
 試薬 7 を 0.2 ml 加えて 30℃  
 にて 2 分間酵素反応を行なう。  
 その間の 340 nm の吸光度の  
 増加 (NADH の生成量 = アセ  
 チル CoA の生成量) を測定す  
 る。次式により酵素活性を算出  
 した。  

$$(\Delta OD / 2 / 6.220) \times$$

$$30 \times \text{希釈率} = \text{酵素液 1 ml 当}$$

$$\text{りの活性 (U/ml)}$$

It takes 2.7 ml of reagent 6 at a test tube (1\*8  
 cm), and it adds 0.1 ml of enzyme liquid diluted  
 suitably, then adds 0.2 ml of reagent 7, and  
 performs an enzyme reaction for 2 minutes at  
 30 degrees C.

It measures an increase (produced amount of  
 NADH = produced amount of the acetyl CoA)  
 with an in the meantime absorbance of 340 nm.  
 It computed the enzyme activity by following  
 Formula.

$(\text{TRIANGLEOD} / 2 / 6.220) * 30 * \text{dilution ratio} =$   
 per 1 ml of enzyme liquid is active (U/ml).

#### 【0061】

【実施例 1】一組換え体微生物  
 の作製—

(1) 大腸菌 1100 株の染色体  
 DNA の調製  
 大腸菌 (Escherichia coli)  
 1100 株 {Max-Plank-Institut (ハ  
 イデルベルグ; ドイツ) より入  
 手} を T-Y 培地 {1% (w/v)  
 トリプトン (Difco 社製)、0.  
 5% 酵母エキス (Difco 社製)、  
 および 0.5% (w/v) NaCl、  
 pH 7.2} 100 ml に接種し、  
 温度 37℃ で 8 時間振盪培養  
 し、培養物を得た。

#### [0061]

[Example 1]

Production of - recombinant body  
 microorganisms -

(1) Manufacture of chromosome DNA of 1100  
 strain of Escherichia colis

1100 strain of Escherichia-coli (Escherichia  
 coli) {Max-Plank-Institut (Heidelberg);

It vaccinates acquisition} into T-Y medium {1%  
 (w/v) trypton (Difco shrine make), 0.5%  
 yeast-extract (Difco shrine make) and  
 0.5%(w/v) NaCl, pH7.2} 100 ml from Germany,  
 it carries out a shaking culture at the  
 temperature of 37 degrees C for 8 hours, it  
 obtained the culture.

#### 【0062】

この培養物を、10,000 rpm  
 で 15 分間、常法により遠心分  
 離処理し、湿潤菌体 0.5 g を  
 得たのち、該菌体から斎藤、三

#### [0062]

It carries out centrifugation treatment of this  
 culture by a conventional method for 15 minutes  
 by 10,000 rpm, after obtaining 0.5g of moisture  
 microbial cells, it obtained Chromosome DNA

浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) により染色体DNAを得た。次いで、この染色体DNA 60  $\mu$ g および制限酵素 Sau3AI (東洋紡績社製) 3 Uを、10 mM トリス塩酸緩衝液 (50 mM NaCl、10 mM  $\text{MgSO}_4$  および 1 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.4) に各々混合し、温度 37°C で 30 分間反応させた。反応終了後、該液を常法により、フェノール抽出処理したのち、エタノール沈殿処理し、この Sau3AI で消化された DNA 断片が再結合することを防止するために、アルカリフォスファターゼ処理 (Molecular Cloning、133-134 頁) し、DNA 断片末端の脱リン酸化を行った。更に常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈殿処理して、Sau3AI で消化された大腸菌 1100 株の染色体 DNA 断片 50  $\mu$ g を得た。

from this microbial cell by the method (Biochem. Biophys. Acta, 72, and 619 (1963)) of Saito and Miura.

Subsequently, it each mixes this chromosome DNA 60 microgram and restriction enzyme Sau3AI (made by Toyobo Co., Ltd.) 3U in 10-mM tris hydrochloric-acid buffer (50 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgSO}_4$  and 1-mM dithiothreitol content, pH 7.4), it made it react for 30 minutes at the temperature of 37 degrees C.

After the reaction completion, by a conventional method, after carrying out phenol extraction treatment, it carries out the ethanol precipitation treatment of this liquid, in order to prevent, it carries out alkaline phosphatase treatment (Molecular Cloning and 133-134 page) of the DNA fragment digested by this Sau3AI recombining, it performed the dephosphorylation of the DNA-fragment terminal.

Furthermore, it carries out phenol extraction treatment by a conventional method, furthermore, it carries out the ethanol precipitation treatment, it obtained chromosome DNA-fragment 50 microgram of 1100 strain of Escherichia coli digested by Sau3AI.

### 【0063】

#### pta の単離

(2) 組換え体プラスミド pPT100DNA の作製

プラスミド pBR322 DNA (Bethesda Research Laboratories 社製) 10  $\mu$ g および制限酵素 BamHI (宝酒造社製) 100 U を 50mM トリス

### [0063]

#### An isolation of pta

(2) Production of recombinant body plasmid pPT100DNA

It mixes plasmid pBR322DNA (made by Bethesda Research Laboratories) 10 microgram, and a restriction enzyme (made by a Takara-Shuzo company) BamHI 100U in 50-mM tris- HCl buffer (100 mM NaCl, 10

-HCl 緩衝液 (100mM NaCl、10 mM MgSO<sub>4</sub> 含有、pH 7.4) に混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させて消化液を得た後、該液を常法によりフェノール抽出およびエタノール沈殿処理して、BamHI で消化されたプラスミド pBR322DNA を得た。

**【0064】**

次いで、この BamHI で消化されたプラスミド pBR322DNA 10 μg、項 (1) で得られた Sau3AI で消化された大腸菌 1100 株の染色体 DNA 断片 10 μg および 5 U の T4 DNA リガーゼ (Boehringer Mannheim 社製) を 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトールおよび 10 mM ATP を含有する 66 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度 16℃ で 16 時間反応させ、DNA を連結させ、種々の組換え体プラスミド DNA を得た。

**【0065】**

そして、ディ・エム・モーリソン (D. M. Morrison) の方法 (Methods in Enzymology, 68, 326-331 (1979)) により、塩化カルシウム処理した大腸菌 1100 株を、上記のように連結させた種々の組換え体プラスミド DNA で形質転換し、アンピシ

mM-MgSO<sub>4</sub> content, pH7.4), after making it react at the temperature of 37 degrees C for 2 hours and obtaining a digestive liquor, it extracts [phenol-] and treats [ethanol-precipitation-] this liquid by a conventional method.

It obtained plasmid pBR322DNA digested by BamHI.

**[0064]**

Subsequently, it added plasmid pBR 322 DNA 10 microgram digested by this BamHI and chromosome DNA fragment 10 microgram of Escherichia coli 1100 strain digested by Sau3AI obtained in item (1) and T4 DNA ligase of 5U (made by Boehringer Mannheim) to 6.6 mM tris hydrochloric acid buffer (pH7.5) containing 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol and 10 mM ATP containing, reacted at the temperature of 16 degrees C for 16 hours, connected DNA., and obtained various recombinant body plasmid DNA.

**[0065]**

And it transforms 1100 strain of Escherichia colis which carried out calcium chloride treatment by the various recombinant body plasmid DNA connected as mentioned above by the method (Methods in Enzymology, 68,326-331 (1979)) of D.M.Morrison (D.M.Morrison), it obtained 3000 strain of transformant of an ampicillin resistance and a

リン耐性およびテトラサイクリン感受性の形質転換株3000株を得た。このようにして得られた形質転換株のPTA活性を前記のようにして測定し、宿主大腸菌1100株よりPTA活性が上昇している形質転換株である大腸菌1100 (pPT100) 株を得た。

tetracycline sensitivity.

Thus, it measures the PTA activity of the obtained transformant as mentioned above, it obtained Escherichia-coli 1100 (pPT100) strain which is transformant in which PTA activity is rising from 1100 strain of host Escherichia colis.

#### 【0066】

(3) 組換え体プラスミド pPT100 DNAの単離

前記大腸菌1100 (pPT100 p) 株から T.Maniasis らの方法 (Molecular cloning、86-96 頁、1982 年 ; Cold Spring Harbor Laboratory 出版) により、組換え体プラスミド pPT100 を単離精製した。すなわち、前記T-Y培地で、37℃、24時間前培養して得た大腸菌1100 (pPT100) 株の培養液20mlを、該培地1lに接種し、37℃で3時間振盪培養したのち、培養液にクロラムフェニコール0.2g添加し、更に同一温度で20時間培養し、培養液を得た。

#### [0066]

(3) Isolation of recombinant body plasmid pPT100 DNA

Method of said Escherichia-coli 1100 (pPT100p) strain to T.Maniasis and others (Molecular cloning and 86-96 page and 1982 year;)

Cold Spring Harbor Laboratory By publication, it isolate-and-purified the recombinant body plasmid pPT100.

That is, it vaccinates into 1l. of this medium 20 ml of culture mediums of Escherichia-coli 1100 (pPT100) strain obtained by cultivating for 24 hours at 37 degrees C ago by said T-Y medium, after carrying out a shaking culture at 37 degrees C for 3 hours, it adds to a culture medium chloram phenicol 0.2g, furthermore, it cultivates at the same temperature for 20 hours, it obtained the culture medium.

#### 【0067】

次いで、この培養液を、常法により10,000rpmで10分間遠心分離処理して湿潤菌体を得た。これを20mlの25% (w/v) ショ糖を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.

#### [0067]

Subsequently, it carried out centrifugation treatment of this culture medium for 10 minutes by 10,000 rpm by the conventional method, and obtained the moisture microbial cell.

After suspending this in 50-mM tris hydrochloric-acid buffer (pH8.0) containing 20

0) に懸濁したのち、さらに、これに、リゾチーム 10 mg、0.25 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 8 ml および 20% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 8 ml を夫々添加し、60℃で30分間、保温して溶菌し、溶菌液を得た。

#### 【0068】

この溶菌液に、5 M NaCl 溶液 13 ml を添加し、4℃で16時間処理したものを常法により15,000 rpm で30分間遠心分離して抽出液を得た。これを常法によりフェノール抽出したのち、常法によりエタノール沈殿処理し、沈殿物を得た。そして、この沈殿物を、常法により減圧乾燥処理したものを、1 mM EDTA を含有する 10 mM トリス塩酸緩衝液 6 ml (pH 7.5) に溶解し、更に、これに塩化セシウム 6 g および 10 mg/ml エチジウムブロマイド 0.2 ml を添加したものを、常法により 39,000 rpm で42時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心処理を行った。該処理物から組換え体プラスミド pPT100DNA を単離し、また、更に、n-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除いたのち、1 mM EDTA 含有の 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対し

ml 25% (w/v) sucrose, it adds lysozyme 10 mg, 8 ml (pH8.0) of 0.25M EDTA solutions, and 8 ml of 20% (w/v) sodium-dodecyl-sulfate solutions to this further, respectively, at 60 degrees C, it retain heats for 30 minutes and carries out the bacteriolysis, it obtained the lysate.

#### [0068]

It adds 13 ml of 5M NaCl solutions to this lysate, it centrifuged by the conventional method what was treated at 4 degrees C for 16 hours for 30 minutes by 15,000 rpm, and obtained the extract.

After carrying out phenol extraction of this by a conventional method, it carries out the ethanol precipitation treatment by a conventional method, it obtained the deposit.

And it dissolves what carried out drying-under-reduced-pressure treatment of this deposit by the conventional method in 6 ml (pH7.5) of 10-mM tris hydrochloric-acid buffer containing 1 mM EDTA, furthermore, it performed balanced density-gradient centrifugation treatment for what added cesium chlorides 6g, and 10-mg/ml ethidium-bromide 0.2 ml to this for 42 hours using the ultracentrifuge by 39,000 rpm by the conventional method.

It isolates recombinant body plasmid pPT100DNA from this processed material, moreover

Furthermore, after excluding the ethidium bromide using n- butanol, it obtained recombinant body plasmid

て透析を行ない純化された組換え体プラスミド pPT100DNA (10.0 kb) 1 mg を得た。

pPT100DNA(10.0kb)1 mg purified by performing a dialysis to 10-mM tris hydrochloric-acid buffer (pH7.5) of 1 mM EDTA content.

#### 【0069】

(4) 新規な組換え体プラスミド pAK222LL の作製  
大腸菌の遺伝子 p t a は、リンケージ・マップ (Microbiological Reviews 第47巻、第2号、180～230頁 (1983年)) 上、アセテートカイネース遺伝子のすぐ下流に位置づけられている。上記 (3) で得られた pPT100DNA と、アセテートカイネース遺伝子を含む pAK122DNA (FERM BP-1534) の制限酵素地図を比較した結果、KpnI と BamHI の間がオーバーラップしていることが明らかとなった。そこで、pAK122DNA 上のアセテートカイネース遺伝子上流にあるプロモーター領域を利用して遺伝子 p t a の発現が可能なプラスミド DNA を以下の通り作製した。

#### [0069]

(4) Production of new recombinant body plasmid pAK222LL

The gene pta of an Escherichia coli is positioned immediately down-stream of an acetate kinase gene on a linkage map (Microbiological Reviews Volume 47, No. 2, 180 - 230 pages (1983)).

It compared the restriction enzyme map of pPT100DNA obtained by said (3), and pAK122DNA (FERM BP-1534) containing an acetate kinase gene.

As a result, it became clear that between KpnI and BamHI(s) overlaps.

Then, it produced the plasmid DNA which can perform the expression of Gene pta using the promoter region in the acetate kinase gene upstream on pAK122DNA as follows.

#### 【0070】

組換え体プラスミド pAK122DNA (FERM BP-1534) 0.2  $\mu$ g 並びに制限酵素 BamHI, HindIII (ともに、宝酒造社製) で切断し、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿処理して、BamHI

#### [0070]

Recombinant body plasmid pAK122DNA (FERM BP-1534) It cuts by 0.2 microgram and restriction enzymes BamHI and HindIII (both Takara-Shuzo company make), it extracts [phenol-] and treats [ethanol-precipitation-] this liquid by a conventional method.

It obtained plasmid pAK122DNA digested by



I, HindIII で消化されたプラスミド pAK122 DNA を得た。次いで、項 (3) で得られた組換え体プラスミド pPT100 DNA 1  $\mu$ g を BamHI、HindIII で反応させて得た消化液を 0.7% アガロースゲル電気泳動したのち、ゲルより 1.6 kb の DNA 断片を R. C. A. Yang らの方法 (Methods in Enzymology, 68 巻, 176 ~ 182 頁, 1971 年) により目的の DNA を溶出した。溶出物をフェノール抽出処理、エタノール沈殿処理をして目的の精製された DNA 断片 0.3  $\mu$ g を得た。

#### 【0071】

上記のようにして得た 0.3  $\mu$ g の BamHI、HindIII で消化したプラスミド pAK122 DNA 及び BamHI、HindIII で消化した 0.3  $\mu$ g の pPT100 プラスミド DNA 由来の 1.6 kb の DNA 断片を、各々 7  $\mu$ l の水に溶解し、これに混液 (77mM トリス塩酸 (pH7.4)/15mM MgCl<sub>2</sub>/15mM ATP) 13  $\mu$ l 及び 1 U の T4DNA リガーゼを添加し、8℃で 18 時間連結反応を行った。この反応液を用いて、Journal of Bacteriology (119 巻、1072 ~ 1074 頁) 記載の形質転換法により、大腸菌 JM101(ATCC33876) 株を形質転換した。得られた形

BamHI and HindIII.

Subsequently, after carrying out the agarose gel electrophoresis of the digestive liquor which it let recombinant body plasmid pPT100DNA 1 microgram obtained by item (3) react by BamHI and HindIII, and obtained it 0.7%, it eluted target DNA for the DNA fragment of 1.6kb(s) from the gel by the method (Methods in Enzymology, 68 volumes, 176 - 182 pages, 1971) of R.C.A. Yang and others.

It obtained DNA-fragment 0.3 microgram which carries out phenol extraction treatment and the ethanol precipitation treatment and by which the objective was purified in the eluate.

#### [0071]

It dissolves respectively the DNA fragment of 1.6kb(s) derived from the pPT100 plasmid DNA of 0.3 microgram digested by plasmid pAK122DNA digested by BamHI of 0.3 microgram obtained as mentioned above, and HindIII and BamHI, and HindIII in the water of 7 $\mu$ l(s), it adds the T4DNA ligase of mixed-liquid (77 mM tris hydrochloric-acid (pH7.4) / 15 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM dithiothreitol / 0.15 mM ATP) 13 microliter and 1U to this, it performed the ligation at 8 degrees C for 18 hours.

It transformed Escherichia-coli JM101 (ATCC33876) strain using this reaction mixture by the method of transforming a Journal of Bacteriology (119-volume, 1072 - 1074 pages) publication.

It examines the restriction enzyme cutting pattern of the plasmid DNA which the obtained

質転換株の含有するプラスミド DNA の制限酵素切断パターンを検討し、目的の組換えプラスミド DNA を得て、pAK222 と命名した。

**【0072】**

次に、pAK222 上の p t a 遺伝子の両外側に EcoRI 切断部位をつけるために、

5'CGCGAATTCGAAGCTTCTA  
GA3'

5'CGCGTCTAGAAGCTTCGAA  
TT3'

の配列からなるオリゴヌクレオタイドを合成し、Mlu I で切断した pAK222 DNA と混合し、T4DNA ligase で連結し、常法に従い大腸菌 JM101 を形質転換した。得られた形質転換株の含有するプラスミド DNA の制限酵素切断パターンを検討した結果、上記オリゴヌクレオタイドが挿入された目的のプラスミド DNA を得て、pAK222L と命名した。

**【0073】**

引き続き、

5'ACTAGTCTCGAGAATTCTA  
GAGC3'

5'TCTAGAATTCTCGAGACTA  
GTGC3'

の配列からなるオリゴヌクレオタイドを合成し、Ksp I (ベーリンガー・マンハイム社製) で

transformant contains, it obtains the target recombinant plasmid DNA, it named it pAK222.

**[0072]**

Next, since an EcoRI cleavage site is attached to both the outer sides of the pta gene on pAK222, 5'CGCGAATTCGAAGCTTCTAGA3'

5'CGCGTCTAGAAGCTTCGAATT3'

It compounds oligonucleotide which is made up of these sequences, it mixes with pAK222DNA cut by MluI, it connects by T4DNA ligase, according to the conventional method, it transformed Escherichia coli JM101.

It examined the restriction enzyme cutting pattern of the plasmid DNA which the obtained transformant contains.

As a result, it obtains the plasmid DNA to have inserted the above-mentioned oligonucleotide, it named it pAK 222L.

**[0073]**

Continuing,

5'ACTAGTCTCGAGAATTCTAGAGC3'

5'TCTAGAATTCTCGAGACTAGTGC3'

It compounds oligonucleotide which is made up of these sequences, it mixes with pAK222L DNA cut by KspI (made by a Boehringer-Mannheim company), it let T4DNA ligase act according to a conventional method,

切断した pAK222L DNAと混合し、常法に従い T4DNA ligase を作用させて連結後、大腸菌 JM101 を形質転換した。得られた形質転換株の含有するプラスミドDNAの制限酵素切断パターンを検討し、上記オリゴヌクレオタイドが挿入された目的のプラスミドDNAを得た。これを pAK222LL と命名した。また、このプラスミドでの大腸菌形質転換体を JM101(pAK222LL) と命名した。尚、図 6 に、項 (1) ～ (4) に記載の pAK222LL 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

and transformed Escherichia coli JM101 after connection.

It examines the restriction enzyme cutting pattern of the plasmid DNA which the obtained transformant contains, it obtained the plasmid DNA to have inserted the above-mentioned oligonucleotide.

It named this pAK222LL.

Moreover, it named the Escherichia-coli transformed body in this plasmid JM101 (pAK222LL).

In addition, the restriction enzyme map showed the procedure of pAK222LL production of a publication to FIG. 6 at item (1)-(4).

#### 【 0 0 7 4 】

##### c y s E の単離

(5) 野生型大腸菌より遺伝子の単離、及び組換え体プラスミドの作製

遺伝子 c y s E は前記 D. D e n k らによって報告 (D.Denk, A.Bock:J.Gen.Microbiol., 133, 515-525 (1987)) された遺伝子塩基配列をもとに P C R 法を用いて単離された。まず、N末端側に相当する

5'ATGTCGTGTGAAGAACTGG  
AA3'

と、C末端側に相当する

5'ACATTAGATCCCATCCCCAT  
ACTCAAATGTATGGTTAATAC  
CGTTGAAATGCTGGTCTAT3'

#### [0074]

An isolation of cysE

(5) They are isolation of gene, and production of recombinant body plasmid from wild-type Escherichia coli.

Based on the gene base sequence reported by said D.Denk and others (1987) (D. Denk, A.Bock:J.Gen.Microbiol., 133,515-525), Gene cysE used PCR method and was isolated.

First, it amounts to a N terminal side.

5'ATGTCGTGTGAAGAACTGGAA3'

It amounts to the C-terminal side.

5'ACATTAGATCCCATCCCCATACTCAAATGTA  
TGGTTAATACCGTTGAAATGCTGGTCTAT3'

About the oligonucleotide which is made up of

の配列からなるオリゴヌクレオチドを、アプライトバイオシステムズ社製 Model392 DNA/RNA シンセサイザーを用いて、常法により合成した。精製は、アプライトバイオシステムズ社製オリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて常法により行った。

these sequences, it is aplite Biosystems company make. Model392 DNA/RNA It compounded by the conventional method using the synthesizer.

It performed purification by the conventional method using the oligonucleotide purification cartridge by an aplite Biosystems company.

#### 【0075】

これら合成オリゴヌクレオチドをプライマーDNAとして用い、in vitro のDNA増幅により cysE 遺伝子を単離した。具体的には、Perkin-Elmer Cetus Instruments 社製の DNA Thermal Cycler、及び宝酒造社製 GeneAmp DNA Amplification Reagen Kit を用い、下記の条件で反応を行った。即ち、項(1)で作製した大腸菌 1100 染色体DNA溶液 20  $\mu$ l (0.8  $\mu$ g / 20  $\mu$ l TE バッファー)に、2N NaOH 10  $\mu$ l および滅菌水 70  $\mu$ l を加え、70℃で、10分間加熱処理した。さらに、7.5M 酢酸アンモニウム 50  $\mu$ l および冷エタノール 450  $\mu$ l を加え、-80℃で30分間放置した後遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、吸引乾固し滅菌水 20  $\mu$ l に溶解した。こうして得られたDNA溶液をテンプレートDNA溶液として用いた。反

#### [0075]

It isolated the cysE gene by DNA amplification of in-vitro, using the these synthetic oligonucleotide as a primer DNA.

Specifically, it performed reaction on condition of the following using DNA Thermal Cycler made from Perkin-Elmer Cetus Instruments, and GeneAmp-DNA Amplification Reagen Kit by a Takara-Shuzo company.

That is, it added 2N NaOH 10 microliter and sterilized-water 70 microliter to Escherichia-coli 1100 chromosome DNA solution 20 microliter (0.8 microgram / 20 microliter TE buffer) produced by item (1), and heat-processed for 10 minutes at 70 degrees C.

Furthermore, it adds 7.5M ammonium-acetate 50 microliter and cold ethanol 450 microliter, and it centrifuges, after neglecting it for 30 minutes at -80 degrees C, it carried out the suction dryness of the precipitation after washing by ethanol 70%, and dissolved in sterilized-water 20 microliter.

It used the DNA solution obtained by carrying out like this as a template DNA solution.

Reaction adds N-terminal-side primer DNA 5 microliter, C-terminal side primer DNA 5

応は、反応バッファー10  $\mu$ l、  
dNTP 混合物16  $\mu$ l、Taq  
polymerase 0.5  $\mu$ l にN末  
端側プライマーDNA 5  $\mu$ l、C  
末端側プライマーDNA 5  $\mu$ l、  
テンプレートDNA 0.2  $\mu$ l、  
滅菌水を加え全量を100  $\mu$ l  
とし、下記の反応温度条件で行  
った。

**【0076】**

即ち、94℃3分、55℃1分  
30秒および72℃2分30秒  
の反応を1サイクル行い、次に  
94℃1分30秒、55℃2分  
および72℃2分の反応を25  
サイクル行った。最後に72℃  
で7分間放置した後、40分か  
けて4℃に下げた。反応終了後、  
増幅された約1 kb のフラグメ  
ントをアガロース電気泳動によ  
り常法により単離精製し、T4  
DNA polymerase を作用させて  
末端を平滑化した。

**【0077】**

プラスミドベクターpBR322D  
NA（宝酒造社製）を EcoR I  
及び Nru I で消化後、DNA  
blunting Kit（宝酒造社製）で平  
滑末端とした。次に、常法に従  
ってアガロースゲル電気泳動を  
おこない、GENECLEAN II KIT  
（フナコシ（株）製）により複

**[0076]**

That is, it performed 1 cycles of 94-degree-C  
3-minute and 55-degree-C 30 seconds of 1  
minute, and 72-degree-C reaction for 2 minutes  
and 30 seconds, and then performed 25 cycles  
of 94-degree-C 1-minute and 30 seconds, and  
55-degree-C 2 minutes, and 72-degree-C  
reaction for 2 minutes.

After neglecting it for 7 minutes at 72 degrees C  
finally, it lowered to 4 degrees C over 40  
minutes.

It isolate-and-purifies the fragment of about 1  
amplified kb by a conventional method  
according to an agarose electrophoresis after  
the reaction completion, it let T4 DNA  
polymerase act and smoothed the terminal.

**[0077]**

It used it as the digesting back by EcoRI and  
NruI, and used plasmid vector pBR322DNA  
(made by a Takara-Shuzo company) as the  
flush end by DNA blunting Kit (made by a  
Takara-Shuzo company).

Next, according to the conventional method, it  
performed the agarose gel electrophoresis, and  
acquired the DNA fragment of about 3.4 kb(s)

製起点を含む約 3.4 kb の DNA 断片を取得した。得られた DNA を T4DNA ligase により環状にした後、EcoRI で切断し、直鎖にした。

**【0078】**

次いで、以下に示すような大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位及びターミネーター等の発現調節領域並びに HpaI 切断部位及びマルチクローニングサイトを含む DNA 配列を DNA Synthesizer Model 392 (アプライドバイオシステムズ社製) をもちいて合成し、上記で得られた EcoRI 断片と連結して発現ベクター pUTE100 を作製した。

AATTCGGTACCGGATCCGCT  
AGCTTTACATTATGCTTCCGG  
CTCGTATAATGTGATGGAATT  
GTGAGCGG

GCCATGGCCTAGGCGATCGA  
AATGTAATACGAAGGCCGAG  
CATATTACACTACCTTAACAC  
TCGCC

ATAACAATTCCATCGTTAGGA  
GGTTTTAGTTAACTAACTAG  
TAGATCTGGTACCG

which contain a replication starting point by GENE CLEAN II KIT (product made from FUNAKOSHI K.K.).

After making annular obtained DNA by T4DNA ligase, it cuts by EcoRI, it made it linear.

**[0078]**

Subsequently, with DNA Synthesizer Model 392 (made by an applied Biosystems company), a DNA sequence including the expression regulation region, a HpaI cleavage site, and multi cloning sites, such as a promoter originating in an Escherichia-coli lactose operon as shown below etc., an operator, a ribosome binding site, and a terminator, is, and it compounds it, it produced the expression vector pUTE100 by bonding with the EcoRI fragment obtained above.

AATTCGGTACCGGATCCGCTAGCTTTACATT  
ATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGATGGAATT  
GTGAGCGG

GCCATGGCCTAGGCGATCGAAATGTAATAC  
GAAGGCCGAGCATATTACACTACCTTAACAC  
TCGCC

ATAACAATTCCATCGTTAGGAGGTTTTAGTTA  
ACTAACTAGTAGATCTGGTACCG

TATTGTTAAGGTAGCAATCCTCCAAAATCAAT

TATTGTTAAGGTAGCAATCCT TGATTGATCATCTAGACCATGGCTTAA  
 CCAAATCAATTGATTGATC  
 ATCTAGACCATGGCTTAA

## 【 0 0 7 9 】

上記で平滑化した 1kb の DNA 断片を pUTE100 の HpaI site に導入し、pOHE100 を得た。大腸菌株 JM101 を該形質転換プラスミドを用いて、前記同様に形質転換して形質転換株 JM101(pOHE100)を得た。

## [0079]

It introduces into HpaI site of pUTE100 the DNA fragment of 1kb smoothed above, it obtained pOHE100.

It transformed the Escherichia-coli strain JM101 to said this shape using this transforming plasmid, and obtained the transformant JM101 (pOHE100).

## 【 0 0 8 0 】

(6) システインによるフィードバック阻害解除型 *cysE* の作製、及び組換え大腸菌の作製さらに、*cysE* における Met256 を Ile256 に変換するために、Kunkel 法 (Proc. Natl. Acad. Sci., 82 巻、488 頁、1985 年) に基づく部位特異的変異処理 (site-directed mutagenesis) を行った。具体的には、Met256 の領域を含むオリゴヌクレオチド (5'-AATGCTGGTCAATATCCAT TG-3') を常法により合成し、T4 polynucleotide kinase によるリン酸化を行った。次に、pOHE100 とリン酸化オリゴヌクレオチドのアニーリング、T4 DNA ポリメラーゼ、T4 DNA リガーゼを用いてのリペアー反応を行った後、このプラスミド DNA を用いて大腸菌の形

## [0080]

(6) Production of feedback-inhibition releasing type *cysE* by cystein, and production of recombinant Escherichia coli

Furthermore, in order to convert Met256 in *cysE* into Ile256, it performed site-specific variation treatment (site-directed mutagenesis) based on Kunkel method (Proc. Natl. Acad. Sci., 82 volumes, 488 pages, 1985).

Specifically, it compounds oligonucleotide (5'-AATGCTGGTCAATATCCATTG-3') including the region of Met256 by a conventional method, it performed phosphorylation by T4 polynucleotide kinase.

Next, after performing repair reaction using the annealing of pOHE100 and the phosphorylation oligonucleotide, T4 DNA polymerase, and the T4 DNA ligase, it performed transforming of an Escherichia coli using this plasmid DNA.

It collects Plasmids DNA from the obtained transformed body, when the base sequence of the *cysE* gene currently coded by it was checked, it became clear that ATG which shows

質転換を行った。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを回収し、それにコードされている *cysE* 遺伝子の塩基配列を確認したところ、Met256 を示す ATG が Ile256 を示す ATT に正しく変換されていることが明らかになった。

Met256 is correctly converted into ATT which shows Ile256.

#### 【0081】

こうして得られた変異型 *cysE* 遺伝子を含むプラスミドを pOHE100T とした。そしてこのプラスミドで、前記 pta の単離に記した方法により大腸菌 JM101 を形質転換し、形質転換大腸菌株 JM101(pOHE100T)を得た。更に、前記同様の調製法で、この形質転換体を用いて、組換え体プラスミド pOHE100TDNA 1 mg を得た。尚、図 7 に、項 (5) ~ (6) に記載の pOHE100T 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

#### [0081]

It set to pOHE 100T the plasmid containing the variant *cysE* gene obtained by carrying out like this.

And by this plasmid, it transforms *Escherichia coli* JM101 by the method described in said isolation of pta, it obtained the transforming *Escherichia coli* strain JM101 (pOHE 100T).

Furthermore, it obtained recombination body plasmid pOHE100TDNA 1 mg by said similar preparation method using this transformed body.

In addition, the restriction enzyme map showed the procedure of pOHE100T production of a publication to FIG. 7 at item (5)-(6).

#### 【0082】

##### *cysK* の単離

(7) 野生型大腸菌より遺伝子の単離、及び組換え体プラスミドの作製

前記 D. Denk らによって報告された遺伝子塩基配列をもとに PCR 法を用いて、*cysK* 遺伝子を単離した。まず、N 末端側に相当する

5'ATGAGTAAGATTTTTGAAGA

#### [0082]

An isolation of *cysK*

(7) They are isolation of gene, and production of recombinant body plasmid from wild-type *Escherichia coli*.

It used PCR method based on the gene base sequence reported by said D. Denk and others, and isolated the *cysK* gene.

First, it amounts to a N terminal side.

5'ATGAGTAAGATTTTTGAAGA3'



3'

とC末端側に相当する

5'CAAGCTGGCATTACTGTTG  
C3'

の配列からなるオリゴヌクレオチドを、アプライトバイオシステムズ社製 Model392 DNA/RNA シンセサイザーを用いて、常法により合成した。精製は、アプライトバイオシステムズ社製オリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて常法により行った。これら合成オリゴヌクレオチドをプライマーDNAとして用い、invitro DNA増幅によりcysK遺伝子を単離した。具体的には、Perkin-ElmerCetus Instruments社製のDNA Thermal Cycler、及び宝酒造（株）製のGeneAmpDNA Amplification Reagent Kitを用い、下記の条件で反応を行った。

## 【0083】

即ち、前記大腸菌 1100 染色体DNA溶液 20 $\mu$ l (0.8 $\mu$ g/20 $\mu$ l TEバッファー) に、2N NaOH 10 $\mu$ l、滅菌水 70 $\mu$ lを加え、70°C、10分間加熱処理した。さらに、7.5M酢酸アンモニウム 50 $\mu$ l、冷エタノール 450 $\mu$ lを加え、-80°Cで30分間放置した後、遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、吸引乾固し滅菌

It amounts to the C-terminal side.

5'CAAGCTGGCATTACTGTTGC3'

About the oligonucleotide which is made up of these sequences, it is aplite Biosystems company make. It compounded by the conventional method using the Model392 DNA/RNA synthesizer.

It performed purification by the conventional method using the oligonucleotide purification cartridge by an aplite Biosystems company.

It isolated the cysK gene by in vitro DNA amplification, using the these synthetic oligonucleotide as a primer DNA.

Specifically, it performed reaction on condition of the following using DNA Thermal Cycler made from Perkin-ElmerCetus Instruments, and GeneAmpDNA Amplification Reagent Kit made from Takara Shuzo.

## [0083]

That is, it added 2N NaOH 10 microliter and sterilized-water 70 microliter to said Escherichia-coli 1100 chromosome DNA solution 20 microliter (0.8 microgram / 20 microliter TE buffer), and heat-processed 70 degrees C for 10 minutes.

Furthermore, it centrifuges, after adding 7.5M ammonium-acetate 50 microliter and cold ethanol 450 microliter and neglecting it for 30 minutes at -80 degrees C, it carried out the

水 20  $\mu$ l に溶解した。こうして得られた DNA 溶液をテンプレート DNA 溶液として用いた。

反応は、反応バッファ 10  $\mu$ l、dNTPmix 16  $\mu$ l、Taq polymerase 0.5  $\mu$ l に N 末端側 DNA 5  $\mu$ l、C 末端側 DNA 5  $\mu$ l、テンプレート DNA 0.2  $\mu$ l、滅菌水を加え全量を 100  $\mu$ l とし、下記の反応温度条件で行った。即ち、STEP 1 (94°C 3 分、55°C 1 分 30 秒、72°C 2 分 30 秒) を 1 サイクル行い、次に STEP 2

(94°C 1 分 30 秒、55°C 2 分、72°C 2 分) を 25 サイクル行った。最後に STEP 3 (72°C 7 分、40 分かけて 4°C におとす) を行った。

suction dryness of the precipitation after washing by ethanol 70%, and dissolved in sterilized-water 20 microliter.

It used the DNA solution obtained by carrying out like this as a template DNA solution.

Reaction adds N-terminal-side DNA 5 microliter, C-terminal side DNA 5 microliter, template DNA 0.2 microliter, and a sterilized water to reaction buffer 10 microliter, dNTPmix 16 microliter, and Taq polymerase 0.5 microliter, and sets the whole quantity to 100 microliter, it carried out on the following reaction temperature conditions.

That is, it performed 1 cycle of STEP(s) 1 (94 degree-C 3 minute, 55 degree-C 1 minute 30 second, 72 degree-C 2 minute 30 second), and then performed 25 cycle of STEP(s) 2 (94 degree-C 1 minute 30 second, 55 degree-C 2 minute, 72 degree-C 2 minute).

Finally it performed STEP 3 ( which it drops on 4 degree C over 7 minutes and 40 minutes 72 degrees C).

#### 【0084】

反応終了後、アガロース電気泳動により約 1 kb のフラグメントを常法により単離精製し、T4 DNA polymerase を作用させて末端を平滑化し、pUTE100 の HpaI sit に導入した。該プラスミド DNA を pOHK100 と命名した。このようにして得られたプラスミドを用い、前記した方法により大腸菌 JM101 を形質転換し、形質転換体大腸菌株 JM101(pOHK100) を得た。更

#### [0084]

It isolate-and-purifies the fragment of about 1 kb by a conventional method according to an agarose electrophoresis after the reaction completion, it lets T4 DNA polymerase act and smooths the terminal, it introduced into HpaI sit of pUTE100.

It named this plasmid DNA pOHK100.

Thus, it transforms Escherichia coli JM101 by the above-mentioned method using the obtained plasmid, it obtained the transformed-body Escherichia-coli strain JM101 (pOHK100).

に、前記同様にして、この形質転換体を用いて、pOHK100 DNA 1 mg を得た。尚、図 8 に、項 (7) に記載の pOHK100 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

Furthermore, it makes it said this shape, it obtained pOHK100 DNA 1 mg using this transformed body.

In addition, the procedure of production of pOHK100 given in item (7) at FIG. 8 is shown by the restriction enzyme map.

#### 【0085】

同一ベクターに cysE および cysK 遺伝子を含む組換え体プラスミド DNA の調製

(8) 組換え体プラスミド pOHC100T の調製

項 (7) で作製した、lac-promoter より発現可能な cysK を保持する pOHK100 を SpeI 切断部位で切断した。次に、項 (6) で作製した pOHE100T を SpeI、NheI で切断し、lac-promoter と変異型 cysE を含む断片を、pOHK100 の SpeI 部位に導入した。その結果、変異型 cysE、cysK (共に lac-promoter の支配下にある) の外側に EcoRI、KpnI 切断部位を共に保持する pOHC100T を得た。そして、このプラスミドを用いて、前記の方法により大腸菌 JM101 を形質転換し、形質転換大腸菌株 JM101(pOHC100T) を得た。更に組換え体プラスミド pOHC100TDNA 1 mg を前記同様にして調製した。

#### [0085]

Manufacture of recombinant body plasmid DNA which contains cysE and a cysK gene to the same vector

(8) Manufacture of recombinant body plasmid pOHC100T

It cut pOHK100 holding cysK which was produced by item (7) and which can express from lac-promoter by the SpeI cleavage site.

Next, it cuts pOHE 100T produced by item (6) by SpeI and NheI, it introduced the fragment containing lac-promoter and Variant cysE into the SpeI part of pOHK100.

As a result, it obtained EcoRI and pOHC100T holding both KpnI cleavage sites on the outer side of Variants cysE and cysK (there is both lac-promoter under control).

And it transforms Escherichia coli JM101 by the above-mentioned method using this plasmid, it obtained the transforming Escherichia-coli strain JM101 (pOHC100T).

Furthermore, it made recombination body plasmid pOHC100TDNA 1 mg into said this shape, and prepared it.

#### 【0086】

#### [0086]

(遺伝子 p t a を含有する組換え体ファージ DNA の調製)

(9) バクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 の調製

特開昭 58-212781 号公報記載の実施例と全く同様にしてバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 [このファージは、このファージを常法により前記記載の大腸菌 1100 に溶原化して得られる溶原菌、すなわち、E.coli 1100( $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121)「微工研条 寄 第 1 3 3 号 (FERM BP-133)」として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。] を調製し、このバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 から、T.Maniatis らの方法 (Molecular Cloning、76~85 頁、1982 年; ColdSpring Harbor Laboratory 出版) によりバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 の DNA を得た。

#### 【0087】

(10) バクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 S の調製

次いで、このようにして得られたバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121 の DNA 2.1  $\mu$ g 及び 10 ユニットの EcoRI (宝酒造社製) を 50 mM トリス-HCl 緩衝液 (100 mM NaCl および 10 mM MgSO<sub>4</sub> 含有、pH7.4) 中で 37℃ で 1 時間反応させた、常法によりフェノール抽出

(Manufacture of the recombinant body phage DNA containing Gene pta)

(9) Manufacture of bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121

It prepared bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121 [the lysogenic bacterium obtained by this phage lysogenizing this phage to Escherichia coli 1100 of said publication by a conventional method, namely, E.coli 1100 (it is consigned to the institute-of-technology Fermentation Research Institute as ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121) "Fermentation-Research-Institute-deposition No. 133 (FERM BP-133).]

It prepares ]by completely same method as the Example of Unexamined-Japanese-Patent No. 58-212781, method of this bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121 to T.Maniatis and others (Molecular Cloning, 76 - 85 pages, 1982 year;) ColdSpring Harbor Laboratory It obtained DNA of bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121 by publication.

#### [0087]

(10) Manufacture of bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121S

Subsequently, it performed phenol extraction and ethanol precipitation by the conventional method to which it let DNA 2.1 microgram of bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121 obtained by doing in this way, and EcoRI (made by a Takara-Shuzo company) of ten units react at 37 degrees C for 1 hour in 50-mM tris- HCl buffer (100 mM NaCl and 10 mM MgSO<sub>4</sub> content, pH7.4), and obtained the EcoRI digest of

及びエタノール沈殿を行いバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121.  
1 の EcoRI 消化物を得た。

**【0088】**

このDNA断片 0.4  $\mu$ g を、 $\lambda$  cl<sub>857</sub> Sam 7 DNA (米国ワシントン社より入手) に添加した後、T4 DNA リガーゼ 1 ユニットを添加し、7℃で48時間保持して、組換え体DNAの混合物を得、更に該DNA混合物を、イン・ビトロ・パッケージング (in vitro packaging) 法 (Methods in Enzymology、68巻、281～298頁、1979年; Academic Press 出版) によりバクテリオファージの被膜蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を得た。

**【0089】**

次いで、この様にして得たバクテリオファージ粒子を大腸菌 QD5003 (九州大学より入手、以下、同株使用) を指示菌としてトリプトン寒天培地上に巻き、37℃で16時間培養した後、生じたプラークを観察した。これより、大腸菌 1100 を指示菌として用いた場合はプラークを形成せず、大腸菌 QD5003 を指示菌として用いた場合はプラークを形成する性質を有し、且つ後期プロモーターP<sub>r</sub> 部位より下流域で、その付着末端に至

**[0088]**

After adding this DNA-fragment 0.4 microgram to ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> Sam 7 DNA (it acquires from a USA Washington company), it adds T4DNA ligase 1 unit, it maintains at 7 degrees C for 48 hours, it obtains the blend of the recombinant body DNA, furthermore, this DNA blend wrapped in the coating-film protein of the bacteriophage by Academic Press publication by the in-vitro- packaging (in vitro packaging) method (Methods in Enzymology, 68 volumes, 281 - 298 pages, 1979 year;), and obtained bacteriophage particles.

**[0089]**

Subsequently, after winding the bacteriophage particles which carried out in this way and were obtained on the trypton agar by having made Escherichia coli QD5003 (they being an acquisition, the following, and this stock use from Kyushu University) into the indicator strain and cultivating them at 37 degrees C for 16 hours, it observed the produced plaque. From this, when Escherichia coli 1100 is used as an indicator strain, it does not form a plaque, but when Escherichia coli QD5003 is used as an indicator strain, it has the characteristic which forms a plaque, and the cleavage site by EcoRI recognizes the one place presence from

るDNA部分にのみ EcoRI による切断部位が一カ所存在し、且つまた、溶菌に関与する遺伝子が該遺伝子変異したDNA断片 ( $\lambda$  cl<sub>857</sub> Sam7 DNA由来) に組み換えられたために、宿主細菌を溶解する能力を欠出したバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121S を分解して得た。

a second-half promoter P'r part in a down-stream region only at the DNA part which leads in the cohesive end, and since the gene which participates in the bacteriolysis was also rearranged by the DNA fragment (( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> Sam7 DNA origin) to which this gene varied, it obtained by degrading bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121S which lacked the capability to dissolve host bacteria.

#### 【0090】

(11)  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121S の後期プロモーターより下流域で、その付着末端に至るDNA部分に存在するエンドヌクレアーゼ切断部位に、PTA 遺伝子断片を挿入した組換え体バクテリオファージ  $\lambda$  EN1121S-PTA の調製  
前項 (10) で得られたバクテリオファージ  $\lambda$  cl<sub>857</sub> 1121SDNA 10  $\mu$ g および、前項で得られた組換え体プラスミド PAK222LLDNA 3  $\mu$ g を混合し、これを 50mM トリス-HCl (pH7.4) / 100mM NaCl / 10mM MgSO<sub>4</sub> の組成の溶液 50  $\mu$ l に添加し、更に 50 ユニットの EcoRI を添加し、37°C で 2 時間作用させた後、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿処理を行い、沈殿物を得、これを 50mM トリス-HCl (pH7.4) / 10mM ジチオスレイトール / 10mM MgCl<sub>2</sub> / 0.1mM ATP の組成の溶液 8  $\mu$ l に添加し、4°C で

#### [0090]

(11) Manufacture of recombinant body bacteriophage ( $\lambda$ )EN1121 S-PTA which inserted the PTA gene fragment in the endonuclease cleavage site which exists in the DNA part which leads in the cohesive end from the second-half promoter of ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121S in a down-stream region  
It mixes bacteriophage ( $\lambda$ )cl<sub>857</sub> 1121SDNA 10 microgram and obtained by said (10), and recombinant body plasmid PAK222LLDNA 3 microgram obtained for the preceding clause, it adds this to solution 50 microliter of a composition of 50-mM tris-HCl (pH7.4) / 100 mM NaCl / 10 mM MgSO<sub>4</sub>, it adds EcoRI of further 50 units, after making it act at 37 degrees C for 2 hours, it performs phenol extraction and the ethanol precipitation treatment by a conventional method, and obtains a deposit, it adds this to solution 8 microliter of a composition of 50 mM tris-HCl (pH7.4) / 10 mM dithiothreitol / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 0.1 mM ATP, it made it act at 4 degrees C for 18 hours, and performed the ligation.

18 時間作用させて連結反応を行った。

**【0091】**

得られたDNA 10  $\mu$ g を前記イン・ビトロ・パッケージング法により $\lambda$ バクテリオファージの被膜蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液 50  $\mu$ l に、大腸菌 1100 (10<sup>9</sup>個/ml、0.5  $\mu$ l) を加え、30℃で30分間孵置した。これに、更にバクテリオファージ $\lambda$ cb2 (10<sup>10</sup>個/ml、0.1 ml) を加え、30℃で30分間孵置した(この操作により非溶原菌は死滅する)。これをT-Y培地に撒き、32℃で16時間培養した。

**[0091]**

It wrapped obtained DNA 10 microgram in the coating-film protein of the (lambda) bacteriophage by said in-vitro- packaging method, and prepared bacteriophage particles. It added Escherichia coli 1100 (10<sup>9</sup> pieces / ml, 0.5 microliter) to this phage particle solution 50 microliter, and kept in incubation for 30 minutes at 30 degrees C. It added bacteriophage (lambda) cb2 (10<sup>10</sup> pieces / ml, 0.1 ml) to this further, and kept in incubation for 30 minutes at 30 degrees C (the non-lysogenic bacterium becomes extinct by this operation). It scattered this to the T-Y medium, and cultivated at 32 degrees C for 16 hours.

**【0092】**

尚バクテリオファージ $\lambda$ cb2 は、大腸菌 K-12 ( $\lambda$ ) (ATCC12435) より、A.D.Kaiser (Virology、3巻、24頁、1957年) および G.kellenberger ら (J.Mol.Biol.、3巻、399~408頁、1961年) の方法により調製した。以上の如くして培養し、生育してきた菌株のうち、 $\lambda$ cl<sub>857</sub> 1121S DNA上に pta 遺伝子を保持する組換え体バクテリオファージDNAによる溶原菌を以下の方法で検索した。そして、

**[0092]**

In addition, it prepared bacteriophage (lambda) cb2 from Escherichia coli K-12 ((lambda)) (ATCC12435) by the method of A.D.Kaiser (Virology, three volumes, 24 pages, 1957), and G.kellenberger and others (J. Mol.Biol., three volumes, 399 - 408 pages, 1961). It cultivates as mentioned above, it searched with the following method the lysogenic bacterium by the recombinant body bacteriophage DNA which maintains a pta gene on (lambda)cl<sub>857</sub> 1121S DNA among the strains which it has grown. And it obtained the lysogenic bacterium which has a pta gene on the bacteriophage DNA of a

数菌株のバクテリオファージ D number strain.  
NA 上に pta 遺伝子を有する溶  
原菌を得た。

**【0093】**

すなわち、上記により得られた  
溶原菌、すなわち、 $\lambda$ cb2 耐性  
且つ温度感受性菌を各々 T-Y  
培地を用いて 32℃ で 16 時間  
振とう培養した。得た培養液 0.  
5 ml を 150 ml 容の三角フラ  
スコ中の 10 ml の T-Y 培地に  
接種し、クレットユニット (Klett  
unit) が約 100 になったところ  
で温度を 43℃ に上昇させて  
25 分間振とうした後再び温度  
を 32℃ に降下させて約 3 時間  
振とう培養を続けた。

**【0094】**

この様にして得た培養液のうち  
1 ml を超音波破碎処理した物  
を細胞抽出液とし、前記記載の  
方法に従い、PTA の酵素活性  
を測定し、活性の高い菌株を選  
択した。この活性の高い溶原菌  
を、10 ml の T-Y 培地を用い  
32℃ で振盪培養した。クレッ  
トユニットが約 100 になった  
ところで温度を 43℃ に上昇さ  
せて 25 分間振盪した後、再び  
温度を 37℃ に降下させて約 3  
時間振盪培養した。該培養液よ  
り等容量のフェノール/クロロ  
ホルム混合溶媒を用いて DNA  
を抽出し、得られた DNA をエ

**[0093]**

Namely, lysogenic bacterium obtained by the  
above, that is, it carried out the shake culture of  
(lambda)cb2 resistance and the temperature  
sensitivity microbe at 32 degrees C for 16 hours  
using the T-Y medium respectively.  
It vaccinates 0.5 ml of obtained culture  
mediums into the 10 ml T-Y medium in a 150 ml  
conical flask, after raising 43 degrees C and  
shaking temperature for 25 minutes in the place  
where Klett unit (Klett unit) became about 100, it  
dropped temperature at 32 degrees C again,  
and continued the shake culture for about 3  
hours.

**[0094]**

Thus, let the thing which carried out ultrasonic  
crushing treatment of the 1 ml of the obtained  
culture medium be a cell extract, according to  
the method of said publication, it measures the  
enzyme activity of PTA, it chose the active high  
strain.  
It carried out the shaking culture of this active  
high lysogenic bacterium at 32 degrees C using  
the 10 ml T-Y medium.  
After raising 43 degrees C and shaking  
temperature for 25 minutes in the place where  
the Klett unit became about 100, again, it  
dropped 37 degrees C and carried out the  
shaking culture of the temperature for about 3  
hours.  
It extracts DNA using the phenol / chloroform



タノール沈殿させてDNAを得た。

mixed solvent of equal volumes from this culture medium, it carried out ethanol precipitation of obtained DNA, and obtained DNA.

#### 【0095】

この様にして得られたDNAをトリス-HCl (pH7.5) / 1mM EDTA 組成の溶液 1 ml に溶解した。該溶液 4  $\mu$  l を 10mM トリス-HCl (pH7.4) / 100mM NaCl / 10mM MgSO<sub>4</sub> / 1mM ジチオスレイトールの組成の溶液 30  $\mu$  l に添加し、更に 50 ユニットの EcoRI および 20  $\mu$  g の RNaseA (シグマ社製) を添加し、37℃で1時間作用させて消化した。これをアガロースゲル電気泳動処理し、DNA 断片の大きさを分析した。

#### [0095]

Thus, it dissolved obtained DNA in 1 ml of solutions of tris- HCl (pH7.5) / 1 mM EDTA composition.

It adds this solution 4 microliter to solution 30 microliter of a composition of dithiothreitol 10-mM tris- HCl (pH7.4) / 100 mM NaCl / 4/1 mM of 10 mM MgSO<sub>4</sub>, it adds RNaseA (made by a sigma company) of EcoRI of further 50 units, and 20 microgram, at 37 degrees C, it made it act for 1 hour, and digested.

It carries out agarose gel electrophoresis treatment of this, it analyzed the size of a DNA fragment.

#### 【0096】

その結果、PTA高活性の溶原菌全てに、約4.6 kbp の組換え体プラスミド PAK222LL DNA由来のDNA断片が検出された。以上の如くして大腸菌 (E.coli)1100(  $\lambda$  EN1121S-PTA) を分離し、所期の組換え体バクテリオファージ  $\lambda$  EN1121S-PTA DNA の調製を行った。尚、図9に、項(9) ~ (11) に記載の  $\lambda$  EN1121S-PTA 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

#### [0096]

As a result, the DNA fragment derived from recombinant body plasmid PAK222LL DNA of about 4.6 kbp(s) was detected by all the lysogenic bacterium of PTA high activity.

It separates Escherichia coli (E. coli) 1100 (( $\lambda$ )EN1121 S-PTA) as mentioned above, it performed manufacture of expected recombinant body bacteriophage ( $\lambda$ )EN1121 S-PTADNA.

In addition, the restriction enzyme map showed the procedure of ( $\lambda$ )EN1121 S-PTA production of a publication to FIG. 9 at item (9)-(11).

## 【0097】

同一ベクターに遺伝子 *cysE*、*cysK* を同時に含有した組換え体ファージDNAの調製

(12) バクテリオファージ  $\lambda$  EN501S-Tc のコート蛋白質製造の遺伝子情報部分に存在するエンドヌクレアーゼ切断部位に、*cysE*、*cysK* 遺伝子を挿入したバクテリオファージ  $\lambda$  EN501S-CYS の調製  
前記記載のバクテリオファージ EN501S-Tc DNA 10  $\mu$ g 及び前記記載の組換え体プラスミド pOHC100T 3  $\mu$ g を混合し、これを 50mM トリス-HCl 緩衝液 (100mM NaCl 及び 10mM MgSO<sub>4</sub> 含有、pH7.5) 50  $\mu$ l に添加し、更に、50U の EcoRI を添加し、37°C で2時間反応させた。該反応物について、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿を行い、沈殿物を得た。これを 50mM トリス-HCl 緩衝液 (10mM MgCl<sub>2</sub> 及び 0.1mM ATP 含有、pH7.4) 8  $\mu$ l に添加し、更に2ユニットの T4DNA リガーゼを添加し、4°C で18時間作用させて連結反応を行った。

## 【0098】

得られた DNA 10  $\mu$ g をイン・ビトロ・パッケージング法により  $\lambda$  バクテリオファージの被覆蛋白質で包み、バクテリオ

## [0097]

Manufacture of the recombinant body phage DNA which contained Genes *cysE* and *cysK* simultaneously to the same vector

(12) Manufacture of bacteriophage ( $\lambda$ )EN501 S-CYS which inserted *cysE* and *cysK* gene in endonuclease cleavage site which exists in gene information part of coat-protein manufacture of bacteriophage ( $\lambda$ )EN501 S-Tc

It mixes bacteriophage EN501 S-Tc DNA 10 microgram of said publication, and recombinant body plasmid pOHC100T 3 microgram of said publication, it adds this to 50-mM tris- HCl buffer (100 mM NaCl and 10 mM-MgSO<sub>4</sub> content, pH7.5) 50 microliter, furthermore, it adds EcoRI of 50U, it made it react at 37 degrees C for 2 hours.

About this reaction material, it performed phenol extraction and ethanol precipitation by the conventional method, and obtained the deposit. It adds this to 50-mM tris- HCl buffer (10 mM-MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM ATP content, pH7.4) 8 microliter, it adds the T4DNA ligase of further 2 units, it made it act at 4 degrees C for 18 hours, and performed the ligation.

## [0098]

It wrapped obtained DNA 10 microgram in the coated protein of the ( $\lambda$ ) bacteriophage by the in-vitro- packaging method, and prepared bacteriophage particles.

ファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液 50  $\mu$  l に大腸菌 1100 ( $10^9$ /ml、0.5  $\mu$  l) を加え 30  $^{\circ}$ C で 3 時間孵置した。これを、更に前記記載の方法と同様に  $\lambda$  cb2 で処理し、更に Tc (テトラサイクリング) 耐性の菌株を選択することにより溶原菌を得た。この溶原菌を T-Y 培地を用いて 32  $^{\circ}$ C で 16 時間振盪培養した。該培養液 0.5 ml を 150 ml 容三角フラスコ中の 10 ml の T-Y 培地に接種し、培養した。クレットユニットが約 100 になったところで温度を 43  $^{\circ}$ C の上昇させて 25 分間振盪培養した後、再度温度を 32  $^{\circ}$ C に降下させて約 3 時間振盪培養を続けた。

**【0099】**

このようにして得た培養液のうち、1 ml を超音波器による破碎処理をした。この破碎物を細胞抽出液とし、J. Gen. Microbiol. (128 巻、1047 ~ 1052 頁、1982 年) に記載の方法に従い、SAT、OASL の酵素活性を測定した。そして、活性の高い株を選択した。この溶原菌より、前記記載の方法と同様にして DNA を抽出し、10 ユニットの EcoRI で 37  $^{\circ}$ C で 2 時間消化した。該消化物の DNA 断片の

It added 1100 ( $10^9$ /ml) Escherichia coli I and 0.5 microliter to this phage particle solution 50 microliter, and kept in incubation at 30 degrees C for 3 hours.

It treats this by ( $\lambda$ ) cb2 still like the method of said publication, furthermore, Tc (tetra-cycling) it obtained the lysogenic bacterium by choosing a resistant strain.

It carried out the shaking culture of this lysogenic bacterium at 32 degrees C for 16 hours using the T-Y medium.

It vaccinates 0.5 ml of this culture medium into the 10 ml T-Y medium in, 150-ml conical flask, it cultivated.

When the Klett unit became about 100, it raised temperature to 43 degrees C and carried out a shaking culture for 25 minutes, after that, it dropped temperature to 32 degrees C again, and continued the shaking culture for about 3 hours.

**[0099]**

Thus, it carried out crushing treatment according 1 ml to an ultrasonic device among the obtained culture mediums.

Let this crushed material be a cell extract, j. According to the method of a publication, it measured the enzyme activity of SAT and OASL to Gen. Microbiol. (128 volumes, 1047 - 1052 pages, 1982).

And it chose the active high strain.

It extracts DNA like the method of said publication from this lysogenic bacterium, it digested at 37 degrees C by EcoRI of ten units for 2 hours.

It applied and analyzed the size of the DNA

大きさを、アガロース電気泳動に掛け、分析した。その結果、SAT、OASL高活性の溶原菌は約2.1 kbpのpOHC100T由来のDNA断片を保持していた。

fragment of this digest to the agarose electrophoresis.

As a result, the lysogenic bacterium of SAT and OASL high activity maintained the DNA fragment derived from pOHC100T of about 2.1 kbp(s).

#### 【0100】

以上の如くして大腸菌(E.coli)1100(λ EN501S-CYS)を分離し、所期の組換え体バクテリオファージλ EN501S-CYSの作製を行った。尚、図10に、項(12)に記載のλ EN501S-CYS作製の手順を制限酵素地図にて示した。

#### [0100]

It separates Escherichia coli (E. coli) 1100 ((lambda)EN501 S-CYS) as mentioned above, it performed production of expected recombinant body bacteriophage (lambda)EN501 S-CYS.

In addition, the restriction enzyme map showed the procedure of (lambda)EN501 S-CYS production of a publication to item (12) at FIG. 10.

#### 【0101】

同一ベクターにcysE、cysK、ptaを同時に含有する組換え体ファージDNAの調製

(13) 大腸菌 1100(501CYS×PTA)の調製

前記記載のバクテリオファージλ EN501S-CYS DNA 10 μg およびλ EN1121S-PTADNA 10 μg を各々混合し、これを50mM トリス-HCl(pH7.5)/10mM MgCl<sub>2</sub>/1mM ジチオスレイトール/100mM NaCl 組成の溶液 50 μl に添加し、更に50ユニットのNheI(ベーリンガーマンハイム山之内社製)を添加し、37℃で2時間作用させた後、常法によりフェ

#### [0101]

Manufacture of the recombinant body phage DNA which contains cysE, cysK, and pta simultaneously to the same vector

(13) Manufacture of Escherichia coli 1100 (501 CYS\*PTA)

It each mixes bacteriophage (lambda)EN501 S-CYS DNA 10 microgram of said publication, and (lambda)EN1121 S-PTADNA 10 microgram, it adds this to solution 50 microliter of a 50-mM tris- HCl(pH7.5) /10 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM dithiothreitol / 100 mM NaCl composition, it adds NheI (made by a Boehringer-Mannheim Yamanouchi company) of further 50 units, after making it act at 37 degrees C for 2 hours, it extracted [ phenol-] and precipitated [ ethanol-] by the conventional method, and obtained the deposit.

ノール抽出及びエタノール沈殿して沈殿物を得た。これを 50mM トリス-HCl(pH7.4)/10mM MgCl<sub>2</sub>/10mM ジチオスレイトール/0.1mM ATP の組成の溶液 8  $\mu$ l に添加し、更に 2 ユニットの T4 DNA リガーゼ (ベーリンガーマンハイム山之内社製) を添加し、4°C で 18 時間作用させて、連結反応を行った。

It adds this to solution 8 microliter of a composition of a 50 mM tris- HCl(pH7.4)/10 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM dithiothreitol / 0.1 mM ATP, it adds the T4DNA ligase (made by a Boehringer-Mannheim Yamanouchi company) of further 2 units, it makes it act at 4 degrees C for 18 hours.

It performed the ligation.

#### 【0102】

得られた DNA 10  $\mu$ g を前記イン・ビトロ・パッケージング法により  $\lambda$  バクテリオファージの被覆蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液 50  $\mu$ l に大腸菌 1100 (10<sup>9</sup>/ml、0.5  $\mu$ l) を加え 30°C で 2 時間孵置した。このものから、前記と同様に  $\lambda$  cb2 で処理し、溶原菌を得た。

#### [0102]

It wrapped obtained DNA 10 microgram in the coated protein of the ( $\lambda$ ) bacteriophage by said in-vitro- packaging method, and prepared bacteriophage particles.

It added Escherichia coli 1100 (10<sup>9</sup>/ml, 0.5 microliter) to this phage particle solution 50 microliter, and kept in incubation at 30 degrees C for 2 hours.

From this thing, it treats by ( $\lambda$ ) cb2 like the above, it obtained the lysogenic bacterium.

#### 【0103】

該溶原菌は、1.5  $\mu$ g/ml のテトラサイクリン含有する培地で生育せず、プラーク形成能を欠失している株として選択した。この選択された組換え体 DNA を含有する菌株より組換え体 DNA を検出する方法を以下に示した。選択された組換え体 DNA を含有する溶原菌を T-Y 培地に接種して、クレッ

#### [0103]

It did not grow by the medium containing a 1.5 microgram/ml tetra-cyclin, but chose this lysogenic bacterium as a strain which is deleting plaque formation ability.

The method to detect the recombinant body DNA from the strain containing this selected recombinant body DNA was shown below.

It vaccinates the lysogenic bacterium containing the selected recombinant body DNA into a T-Y medium, after raising 43 degrees C and shaking

トユニットが約100になったところで温度を43℃に上昇させて25分間振とうした後再び、温度を32℃に降下させて約3時間振とうを続けた。このようにして得られた培養液にクロロホルム50μlを添加し、更に温度32℃で20分間振とうを続け（この操作により溶菌する。）、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿を行いDNAを抽出した。

#### 【0104】

このようにして得られたDNAを、前記の如くしてEcoRIで処理し、アガロース電気泳動にかけDNA断片の大きさを分析した。その結果、選択された溶原菌の保持する組換え体DNAは、cysE、cysK遺伝子を含むpOHC100Tおよびpta遺伝子を含むpAK222LL由来のDNA断片を保持することが判明した。以上の如くして大腸菌(E.coli)1100 (λ 501CYS × PTA)を分離した。尚、図11に、項(13)に記載のλ 501CYS × PTA 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

#### 【0105】

〔実施例2〕 大腸菌形質転換体1100 (λ 501CYS × PTA)株を用いるL-含硫アミノ酸の製造

temperature for 25 minutes in the place where the Klett unit became about 100, again, it dropped temperature at 32 degrees C, and continued shaking for about 3 hours.

Thus, it adds chloroform 50 microliter to the obtained culture medium, furthermore, it continued shaking for 20 minutes at the temperature of 32 degrees C (it carries out the bacteriolysis by this operation), performed phenol extraction and ethanol precipitation by the conventional method, and extracted DNA.

#### [0104]

Thus, it treats obtained DNA by EcoRI as mentioned above, it applied to the agarose electrophoresis and analyzed the size of a DNA fragment.

As a result, it became clear that the recombinant body DNA which the selected lysogenic bacterium maintains maintained the DNA fragment derived from pAK222LL containing cysE, pOHC100T containing a cysK gene, and a pta gene.

It separated Escherichia coli (E. coli) 1100 ((lambda) 501CYS\*PTA) as mentioned above.

In addition, (lambda) 501CYS\*PTA given in item (13) at FIG. 11 The restriction enzyme map showed the procedure of production.

#### [0105]

##### [Example 2]

Manufacture of L- sulfur containing amino acid using - Escherichia-coli transformed-body 1100 strain ((lambda) 501CYS\*PTA) -

前記記載の大腸菌 1100(  $\lambda$  501CYS $\times$ PTA)株をT-Y培地 (トリプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%) 2ml 中に接種し、30度で16時間振とう培養した。

**【0106】**

得られた培養物 1ml を、500ml 容枝付き三角フラスコに分注し、滅菌した 50ml のTY培地 (トリプトン2%、酵母エキス1%、塩化ナトリウム0.75%、塩化マグネシウム1mM) に接種し、32℃で振盪培養し、クレットユニットが約100になったところで温度を42℃に上昇させて20分間振盪培養した。再び、温度を37℃に降下させて約4時間振盪培養を続けた。

**【0107】**

培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) に懸濁後超音波破碎し、粗酵素液とした。得られた粗酵素液 (80  $\mu$ g 蛋白質相当量) を、セリン 20mM、アセチルCoA 0.1mM (L-セリン1mmol あたり0.005mmolである)、アセチルリン酸 40mM、硫化水素 20mM、EDTA0.8mM、ピリドキサルリン酸 0.2mM を含む 10mMリン酸カリウム緩衝液

It vaccinates Escherichia-coli 1100 ( $\lambda$  501CYS\*PTA) strain of said publication into 2 ml (trypton 1%, 0.5% of yeast extract, 0.5% of sodium chloride) of T-Y media, it carried out the shake culture at 30 degrees for 16 hours.

**[0106]**

It dispenses 1 ml of obtained cultures to a conical flask with the 500-ml branch, it vaccinates 50 ml TY medium (trypton 2%, 1% of yeast extract, 0.75% of sodium chloride, 1 mM of magnesium chloride) which sterilized, it carries out a shaking culture at 32 degrees C, it raised 42 degrees C and carried out the shaking culture of the temperature for 20 minutes in the place where the Klett unit became about 100. Again, it dropped temperature at 37 degrees C, and continued the shaking culture for about 4 hours.

**[0107]**

After the culture completion, it centrifuges a culture medium, collects microbial cells, and carries out after-suspension ultrasonic-wave crushing at 10-mM potassium phosphate buffer (pH7.5), it considered it as crude-enzyme liquid. It let the obtained crude-enzyme liquid (80 microgram protein equivalent amount) react for 30 minutes at 30 degrees C in addition to 0.5 ml (pH7.5) of 10-mM potassium phosphate buffer containing serine 20 mM, 0.1 mM (for it to be 0.005 mmol per L- serine 1 mmol) of acetyl CoA, 40 mM of acetyl phosphate, 20 mM of hydrogen sulfide, EDTA0.8 mM, and 0.2 mM of

0.5 ml (pH 7.5)に加え、30℃で30分間反応させた。反応終了後直ちにミリポア Ultra free C3GC (MW=10000)を用いて膜濾過することにより菌体を除いた反応液を得た。

pyridoxal phosphate.

It is Millipore immediately after the reaction completion. It obtained the reaction mixture except a microbial cell by carrying out a membrane filtration using Ultra free C3GC (MW = 10000).

#### 【0108】

なお、上記反応液中のSAT活性は0.16U、OASL活性は3.7U、PTA活性は3.0Uであった。反応終了後の反応液中のL-含硫アミノ酸の含有量を測定して表1に示した(本発明1)。また、比較のため、cysEおよびcysK遺伝子のみを強化したプラスミドDNAを有する大腸菌1100株(λEN501S-CYS)についても同様にL-含硫アミノ酸の生成反応を行った(対照1)。これらの結果をまとめて表1に示した。

#### [0108]

In addition, as for the SAT activity in the above-mentioned reaction mixture, 3.7U and the PTA activity of 0.16U and OASL activity were 3.0U.

It measured the content of L- sulfur containing amino acid in the reaction mixture after the reaction completion, and was shown in Table 1 (this invention 1).

Moreover, it performed formation reaction of L- sulfur containing amino acid similarly about 1100 strain ((lambda)EN501 S-CYS) of Escherichia colis which have the plasmid DNA which reinforced only cysE and a cysK gene for the comparison (control 1).

These results were collectively shown in Table 1.

#### 【0109】

#### [0109]

#### 【表1】

#### [TABLE 1]

菌 株	Strain
L-含硫アミノ酸生産量 (mM/30min.)	L- sulfur-containing-amino-acid throughput (mM/30min.)



(本発明 1)	大腸菌 1100	(This invention 1)	Escherichia coli 1100
1	2	1.2	
(λ501CYS×PTA)		((λ)501CYS*PTA	
(対照 1)	大腸菌 1100	(Control 1)	Escherichia coli 1100
0.6		0.6	

(λEN501S-CYS)

((λ)EN501S-CYS)

**【0110】**

表1より、本発明により得られる、すなわち、大腸菌 1100(501CYS×PTA)から得られる粗酵素液は、対照の粗酵素液に比してL-含硫アミノ酸の生産量が増加して、PTAの存在によるアセチルCoA再生系の強化の効果がでていることがわかる。なお、上記対照1において、L-含硫アミノ酸の製造量を本発明のものにするためには、アセチルCoAの反応液中の濃度を0.3 mM (L-セリン 1 mmol あたり 0.015 mmol) にする必要があった。

**[0110]**

It is obtained by this invention from Table 1, that is, as compared with the crude-enzyme liquid of a control, the throughput of L- sulfur containing amino acid increases the crude-enzyme liquid obtained from Escherichia coli 1100 (501 CYS\*PTA), it turns out that the effect of the reinforcement of an acetyl-CoA regenerating system which it depends in the presence of PTA has shown up.

In addition, in the above-mentioned control 1, in order to make the amount of manufacture of L-sulfur containing amino acid into this invention, it needed to set concentration in the reaction mixture of the acetyl CoA to 0.3 mM (0.015 mmol per L- serine 1 mmol).

**【0111】**

〔実施例 3〕 大腸菌 JM101(pOHE100) 株、JM101(pOHE100T) 株、JM101(pOHK100) 株および JM101(pAK222LL) 株を実施例 2 と同様に各々培養した。更に、各々の菌体について、実施例 2

**[0111]****[Example 3]**

Escherichia-coli JM101 (pOHE100) strain and JM101 (pOHE 100T) A strain, JM101 (pOHK100) strain, and JM101 (pAK222LL) It each cultivated the strain like Example 2. Furthermore, it prepared crude-enzyme liquid like Example 2 about each microbial cell.

と同様にして粗酵素液を調製した。各粗酵素液を、表 2 に示す活性になるように添加する以外は、実施例 2 と同様に L- 含硫アミノ酸の生成反応を行った。そして、L- 含硫アミノ酸の生産量を測定し、結果を表 2 に示した。

It performed formation reaction of L- sulfur containing amino acid like Example 2 except adding each crude-enzyme liquid so that it may become active as shows in Table 2. And it measures the throughput of L- sulfur containing amino acid, the result was shown in Table 2.

【0 1 1 2】

[0112]

【表 2】

[TABLE 2]

菌株		添加し	Strain	It added.
た	添加した酵素	L-	Added enzyme	L- sulfur containing amino
含硫アミノ酸	酵素の種類	活性 (U)	Kind of enzyme	Active (U)
生産量(mM/30min.)			Throughput (mM/30min.)	
(本発明 2)			(This invention 2)	
JM101(pOHE100T) 株	S		JM101 (pOHE 100T) stock	SAT <sup>1</sup>
AT <sup>1</sup> 0. 1 6			0.16	
JM101(pOHK100)株	O A S L		JM101 (pOHK100) strain	OASL
3. 7 0. 9 5			3.7 0.95	
JM101(pAK222LL) 株	P T A		JM101 (pAK222LL) Strain	PTA
3. 0			3.0	
(本発明 3)			(This invention 3)	
JM101(pOHE100)株	S A T		JM101 (pOHE100) strain	SAT
1 6. 0			16.0	
JM101(pOHK100)株	O A S L		JM101 (pOHK100) strain	OASL
3. 7 0. 4 5			3.7 0.45	

JM101(pAK222LL) 株 P T A	JM101 (pAK222LL) Strain	PTA
3. 0	3.0	
(対照 2)	(Control 2)	
JM101(pOHE100T) 株 S A T <sup>1</sup>	JM101 (pOHE 100T) stock	SAT <sup>1</sup>
0. 1 6	0.16	
JM101(pOHK100)株 O A S L	JM101 (pOHK100) strain	OASL
3. 7	0. 2 6	3.7 0.26
(対照 3)	(Control 3)	
JM101(pOHE100)株 S A T	JM101 (pOHE100) strain	SAT
1 6. 0	16.0	
JM101(pOHK100)株 O A S L	JM101 (pOHK100) strain	OASL
3. 7	0. 1 5	3.7 0.15

注 1) S A T<sup>1</sup> : L-システイン  
 によるフィードバック阻害を受  
 けにくくなった  
 酵素

Notes 1 SAT<sup>1</sup>: It stopped receiving the feedback  
 inhibition by L- cystein.  
 Enzyme

### 【 0 1 1 3 】

表 2 から、本発明の方法による  
 場合、L-含硫アミノ酸の生産  
 量が対照のものに比べて、高い  
 ことがわかる。即ち、P T Aを  
 添加してアセチルC o A再生系  
 を強化すると、L-含硫アミノ  
 酸の生産量が増加している。ま  
 た、S A T活性がL-システイ  
 ンによるフィードバック阻害を  
 受けにくくなったものでは、そ  
 の生産量がより顕著に増加して  
 おり（本発明 3）、反応液に添加  
 するS A Tの量も本発明 2 の約  
 1 / 1 0 0 でよいことがわか

### [0113]

Table 2 shows that the throughput of L- sulfur  
 containing amino acid is high compared with a  
 control, when based on the method of this  
 invention.

That is, if PTA is added and an acetyl-CoA  
 regenerating system is reinforced, the  
 throughput of L- sulfur containing amino acid  
 will increase.

Moreover, in the one in which SAT active  
 became hard to receive feedback inhibition by  
 L-cystein, the throughput is increasing more  
 notably (this invention 3), it is turned out that the  
 quantity of SAT to add to a reaction mixture is  
 enough to be about 1/100 of this invention.

る。

**【0114】**

〔実施例4〕大腸菌 1100 ( $\lambda$  EN501S-CYS) 株、および 1100 ( $\lambda$  EN1121S-PTA) 株を実施例 2 と同様に各々培養した。更に、各々の菌体について、実施例 2 と同様にして粗酵素液を調製した。各粗酵素液を、表 3 に示す活性になるように添加する以外は、実施例 2 と同様に L-含硫アミノ酸の生成反応を行った。そして、L-含硫アミノ酸の生産量を測定し、結果を表 3 に示した。

**[0114]**

**[Example 4]**

Escherichia-coli 1100 (( $\lambda$ )EN501 S-CYS) A strain and 1100 It each cultivated the strain (( $\lambda$ )EN1121 S-PTA) like Example 2. Furthermore, it prepared crude-enzyme liquid like Example 2 about each microbial cell. It performed formation reaction of L- sulfur containing amino acid like Example 2 except adding each crude-enzyme liquid so that it may become active as shown in Table 3. And it measures the throughput of L- sulfur containing amino acid, the result was shown in Table 3.

**【0115】**

**[0115]**

**【表 3】**

**[TABLE 3]**

菌株			添加		Strain		It added.	
した 添加した酵素			L-		Added enzyme		L- sulfur containing amino	
含硫アミノ酸					acid			
酵素の種類			活性 (U)		Kind of enzyme		Active (U)	
生産量(mM/30min.)					Throughput (mM/30min.)			
(本発明 4)					(This invention 4)			
1100 ( $\lambda$ EN501S-CYS) 株			S		1100 (( $\lambda$ )EN501 S-CYS) Stock		SAT <sup>1</sup>	
AT <sup>1</sup>	0.16				0.16			
O A S L		3.7			OASL	3.7	0.88	
0.88								

1100 ( $\lambda$ EN1121S-PTA)株	P	1100 ((lambda)EN1121 S-PTA) Strain	PTA
TA	3.0	3.0	
(対照4)		(Control 4)	
1100 ( $\lambda$ EN501S-CYS)株	S	1100 ((lambda)EN501 S-CYS) Stock	SAT <sup>1</sup>
AT <sup>1</sup>	0.16	0.16	
OASL	3.7	0.30	
0.30			

注1) SAT<sup>1</sup> : L-システイン  
 によるフィードバック阻害を受  
 けにくくなった  
 酵素

Notes 1 SAT<sup>1</sup> : It stopped receiving the feedback  
 inhibition by L- cystein.  
 Enzyme

#### 【0116】

表3から、本発明の方法による  
 場合、L-含硫アミノ酸の生産  
 量が対照のものに比べて、高い  
 ことがわかる。即ち、PTAを  
 添加してアセチルCoA再生系  
 を強化すると、L-含硫アミノ  
 酸の生産量が増加している。

#### [0116]

Table 3 shows that the throughput of L- sulfur  
 containing amino acid is high compared with a  
 control, when based on the method of this  
 invention.

That is, if PTA is added and an acetyl-CoA  
 regenerating system is reinforced, the  
 throughput of L- sulfur containing amino acid  
 will increase.

#### 【0117】

#### 【発明の効果】

本発明によれば、SAT、PTA  
 AおよびOASL生産能に優れた  
 形質転換体を用いることによ  
 り、L-セリンからL-含硫ア  
 ミノ酸を簡便に、しかも従来法  
 と比較して、高収率で製造する  
 ことができる。しかも、PTA  
 とアセチルリン酸との存在下で

#### [0117]

#### [ADVANTAGE OF THE INVENTION]

According to this invention, moreover compared  
 with a conventional method, it can manufacture  
 L- sulfur containing amino acid by a high-yield  
 rate easily from L- serine by using the  
 transformed body excellent in SAT, PTA, and  
 the OASL producing ability.

And it is not necessary to add a lot of acetyl  
 CoA, and can cheaply manufacture L- sulfur

反応を行うことから、大量のアセチルC o Aを添加する必要がなく、L-含硫アミノ酸を安価に製造することができる。

containing amino acid from performing reaction in the presence of PTA and acetyl phosphate.

**【図面の簡単な説明】****[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]****【図 1】**

p t a 遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出された P T A のアミノ酸配列を示す図である。

**[FIG. 1]**

It is the figure showing the amino acid sequence of PTA drawn from the base sequence and this base sequence of a pta gene.

**【図 2】**

p t a 遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出された P T A のアミノ酸配列を示す図である (つづき)。

**[FIG. 2]**

It is the figure showing the amino acid sequence of PTA drawn from the base sequence and this base sequence of a pta gene (continuation).

**【図 3】**

p t a 遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出された P T A のアミノ酸配列を示す図である (つづき)。

**[FIG. 3]**

It is the figure showing the amino acid sequence of PTA drawn from the base sequence and this base sequence of a pta gene (continuation).

**【図 4】**

c y s E 遺伝子の塩基配列を示す図である。

**[FIG. 4]**

It is the figure showing the base sequence of a cysE gene.

**【図 5】**

c y s K 遺伝子の塩基配列を示す図である。

**[FIG. 5]**

It is the figure showing the base sequence of a cysK gene.

**【図 6】**

pAK222LL 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 6]**

It is the figure having shown the procedure of pAK222LL production with the restriction

enzyme map.

**【図 7】**

pOHE100T 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 7]**

It is the figure having shown the procedure of pOHE100T production with the restriction enzyme map.

**【図 8】**

pOHK100 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 8]**

POHK100 It is the figure having shown the procedure of production with the restriction enzyme map.

**【図 9】**

$\lambda$  EN1121S-PTA 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 9]**

It is the figure having shown the procedure of ( $\lambda$ EN1121 S-PTA production with the restriction enzyme map.

**【図 10】**

$\lambda$  EN501S-CYS 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 10]**

It is the figure having shown the procedure of ( $\lambda$ EN501 S-CYS production with the restriction enzyme map.

**【図 11】**

$\lambda$  501CYS $\times$ PTA 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

**[FIG. 11]**

( $\lambda$ EN501CYS\*PTA) It is the figure having shown the procedure of production with the restriction enzyme map.

【図 1】

[FIG. 1]

```

CTGCCGTATTTACACGCCAGCTCAGCTGTGTGTTTGTAAACCCGCCAAATCGCGTTAACGAAGAGGATAAACCGTGT 80
S R I I M L I P T G T S V G L T S V A W R D P C N G T 28
CCCGTATTATTATGCTGATCCCTACCGGAACCGCTCGGTCTGACACCGCTAGCTTGGCGTGATCCGTGCAATGGAACC 160
Q R R S S E R F O T Y R S A A Y R W R C A D O T T T I 55
CAAAGGCGTTCTGAGCGTTTCAAACCTATCGCTCAGCCCGTACCGGTGGCGATGCCCGATCAGACTACGACTAT 240
V R A N S S T T T A A E P L K H S Y V E G L L S S N 81
CGTCCGTCCGAACCTCTCCACACGACGGCGGTGAACCGCTGAAATGAGCTACGTTGAAGGTCTGCTTTCCAGCAATC 320
Q K D V L H E E I V A N Y H A N T K D A E V V L V E G 108
AGAAAGATGCTGATGGAAGAGATCGTCGCAAACTACCAACCTAACACCAAGACGCTGAAGTCGTTCTGGTTGAAGGT 400
L V P T E K H Q F A Q S L N Y E I A K T L N A E I V F 135
CTGGTCCCGACAGTAAGCACCAGTTTGGCCAGTCTCTGAACCTACGAAATCGCTAAACCGTGAATGCGGAAATCGTCTT 480
V M S O G T D T P E Q L K E R I E L T R N S F G G A 161
CGTTATGCTCTCAGGCACTGACACCCCGGAACAGCTGAAAGAGCGTATCGAAGTACCCGCAACAGCTTCGGCGGTGCCA 560
K N T N I T G V I V N K L N A P V D E O G R T R P D L 188
AAAACACCAACATCACCAGCGTTATCGTTAAACAACTGAACGCAACCGTTGATGAACAGGCTCTACTCGCCCGGATCTG 640
S E I F D D S S K A K V N N V D P A N V Q E S S P L P 215
TCCGAGATTTTCAGAGACTCTTCCAAAGCTAAAGTAAACATGTTGATCCGGCGAAGCTGCAAGAAATCCAGCCCGCTGCC 720
V L C A V P H S F D L I A T R A I D M A R H L N A T 241
GGTTCTCGGCGCTGTGCGGTGGAGCTTTGACCTGATCGCGACTCGTGGCATCGATGCGCTCGCCACCTGAATCGGACCA 800
I I N E G D I N T R R V K S V T F C A R Q H S A H A G 268
TCATCAACGAAGCGACATCAATACTCGCCGCGTTAAATCCGTCACTTTCTGCGCACGCCAGCATTCGCGACATGCTGGA 880

```

pta遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列

Base sequence of pta gene and amino acid sequence of PTA

【図 2】

[FIG. 2]

```

A L R A G S L L V T S A D R P D V L V A A C L A A M N 295
GCATCTCGTCCGGTCTCTGCTGCTGACTTCCGACAGCGTCTGACGTGCTGGTGGCCGCTTGCCCTGGCAGCCATGAA 960
G V E I G A L L L T G G Y E M D A R I S K L C E R A 321
CGGGCTAGAAATCGGTGCCCCGCTGCTGCTGACTGGCGGTACGAAATGGACGCCGCAITTTCTAAACTGTGCGAACGTGCTT 1040
F A T G L P V M V N T W Q T S L S L Q S F N L E 348
TCGCTACCGGCCCTCCCGGTATTTATGGTGAACACCAACACCTGGCAGACCTCTCTGAGCCTGCAGAGCTTCAACCTGGAA 1120
V P V D D H E R I E K V Q E Y V A N Y I N A D W I E S 375
GTTCCGGTTGACGATCACGAACGTATCGAGAAAGTTGAGGAATACGTGCTAACTACATCAACGCTGACTGGATCGAATC 1200
L T A T S E R S R R L S P P A F R Y Q L T E L A R K 401
TCTGACTGCCACTTCTGAGCGCAGCGCTGCTCTGCTCCGCTGCGTTCCGTATCAGCTGACTGAACCTGCGCGCAAAG 1280
A G K R I N L P E G D E P R T V K A A A I C A E R G I 428
CGGGCAACGTATCGTACTGCCGAAGGTGACGAACCGCTACCGTTAAAGCAGCCGCTATCTGTGTGAACGTGGTATC 1360
A T C V L L G N P A E I N R V A A S Q G V E L G A G I 455
GCAACTTCCGTACTGCTGGTAAATCCGCGAGAGATCAACCGTGTGTCAGCGCTCTCAGGTGTAGAATGGGTGCAGGGAT 1440
E I V D P E V V R E S Y V G R L V E L R K N K G M T 481
TGAAATCGTTGATCCAGAAGTGGTTCCGGAAGCTATGTTGGTCTGCTGGTGAACCTGCGTAAGAACAAGGCATGACCG 1520
E T V A R E O L E D N V V L G T L M L E Q D E V D G L 508
AAACCGTTCGCCCGGAACAGCTGGAAGACAACGTGGTCTGCTGCTGACGCTGATGCTGGAACAGGATGAAGTIGATGGTCTG 1600
V E G A V H T T A N T I R P P L Q L I K T A P G S S L 535
GTTTCGGGTGCTGTTCACTACCGCAACACCATCCGTCCGCGCTGACGCTGATCAAACTGCACCGGGCAGCTCCCT 1680
V S S V F P M L L P E Q V Y V Y G D C A I N P D P T 561
GGTATCTTCGGTCTTCTTATCTGCTGCTGCGGAACAGGTTTACGTTTACGGTGACTGTGCGATCAACCCGATCCGACCG 1760
A E Q L A E I A I Q S A D S A A A F G I E P R V A M L 588

```

pta遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列 (つづき)

Base sequence of pta gene and amino acid sequence of PTA (continued)



【図 3】

[FIG. 3]

```

CTGAACAGCTGGCAGAAATCGGATTACGTCGGCTGATTCGGCTGGGGCTTCGGTATCGAACCGGGCTTGCATGCTC 1840
S Y S T G T S G A G S D V E K V R E A T R L A Q E K R 615
TCCTACTCCACCGGTACTCTCGTCAGGTAGCGACGTAGAAAAAGTTCGGAAGCAACTCGTCTGGCGCAGGAAAAACG 1920
P D L M I D G P L Q Y D A A V M A D V A K S K A P N 641
TCCTGACCTGATGATCGACGGTCCGCTGCAGTACGACGCTGCGGTAATGGCTGACGTTGCGAAATCCAAAGCGCCGAAC 2000
S P V A G R A T V F I F P D L N T G N T T Y K A V Q R 668
CTCCGGTTGCAGGTGCGCTACCGTGTTCATCTTCCGGATCTGAACACCGGTAAACACCACTACAAAGCGGTACAGCGT 2080
S A D L I S I G P M L Q G M R K P V N D L S R G A L V 695
TCTGCCGACCTGATCTCCATCGGGCCGATGCTGCAGGGTATGCGCAAGCCGGTTAACGACCTGTCCCGTGGCGCACTGGT 2160
D D I V Y T I A L T A I Q S A Q Q Q * 713
TGACGATATCGCTACACCATCGCGCTGACTGCGATTACGTCGACAGCAGTAATCTCGTCATCATCGCAGCTTTC 2240
CGCTGCGGATATCTGAACCGGAAATTAATCACTATTTCGGTITTTTATTCTCTTAATTGGCATTAAATCCTTCTGATTAT 2320
CTTGCTTAATCGCGTGCATCAATGAATTGCGCCATCCCACTTTGCATACCTTACCACCTTTGTTTGTGCAAGGGAATATT 2400
TGCGCTATGTCCGCAATCACTGAATCCAAACCAACAAGAAGATGGGCAATGCCGATACGTTGGTGATTATCTTTTGT 2480
TGCTATTTTAACGACCTTGCCACCTGGGTAGTTCGGTGGGGATGTTTACAGTCAGGAAGTGAGTATCAGGTTGATG 2560
GTCAACAAAAACAGCGAAAGTCGTAGATCCAAACCAATTTCCGGCATTTCTGACACCTAACCGAAACAGCGCCGSAAC 2640
CTGAAGTATCAACCGCGGATCAGCTGTTACGACGGCGGATGAACGCCCGGG 2694

```

p t s 遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列 (つづき)

Base sequence of pta gene and amino acid sequence of PTA (continued)

【図 4】

[FIG. 4]

```

10 20 30 40 50 60
ATGTCCTGTG AAGAACTGGA AATTGCTGG AACATATTA AAGCGAAGC CAGAAGCGTG
70 80 90 100 110 120
CGGACTGTG AGCCAATGCT GGCCAGTTTT TACCACGCGA CGCTACTCAA GCACGAAAC
130 140 150 160 170 180
CTTGGCAGTG CACTGAGGTA CATGCTGGCG AACAAAGTGT CATGCCAAT TATGCTGCT
190 200 210 220 230 240
ATTGCTATCC GTGAAGTGT GGAAGAAGCC TAGCCCGCTG ACCCGGAAT GATCGCTCT
250 260 270 280 290 300
CGGGCTGTG ATATTCAGGC GGTGCGTACC CGCGACCCGG CAGTCGATAA ATACTCAACC
310 320 330 340 350 360
CCGTTGTTAT ACCTGAAGGG TTTTCATGCC TTGCAGGCCT ATCGCATCGG TCACTGGTTG
370 380 390 400 410 420
TGAATCAGG GCGTCGCGC ACTGGCAATC TTTCTGAAA ACCAGTTTC TGTGACGTT
430 440 450 460 470 480
CAGGTCGATA TTCACCCGGC AGCAAAATTT GGTGCGGTA TCATGCTGA CCACGGGACA
490 500 510 520 530 540
GCGATCGTCG TTGGTGAAC GCGGTGATT GAAAACGACG TATCGATCT GCAATCTGTG
550 560 570 580 590 600
ACGCTTCGGG GTACGGTAA ATCTGGTGGT GACCGTCACC CGAAATTCG TGAAGGTGTG
610 620 630 640 650 660
ATGATTGGCC CGGGCGGAA AATCCTCGGC AATATTGAAG TTGGGCGCG CGCGAAGATT
670 680 690 700 710 720
GGCGCAGGTT CCGTGGTGCT GCAACCGGTG CGCGCGGATA CCACCGCCGC TGGCCTTCG
730 740 750 760 770 780
GCTCGTATTC TCGGTAAAC AGACAGCGAT AAGCCATCAA TCGAATGGA CGAGCATTC
790 800 810 820
AACGGTATTA ACCATACATT TGATATGGG GATGGGATCT ATGCT

```

終止コドン

c y s E 遺伝子の塩基配列

Base sequence of cys E gene

【図 5】

[FIG. 5]

```

      10      20      30      40      50
ATGAGTAAAG TTTTGAGCA TAACTCGCTG ACTATCGGTC ACACGCCGCT GGTTCGCCCTG
      60      70      80      90     100     110     120
AATCCGATCG GTAACGGACG CATTCTGGCG AAGGTGGAAT CTCGTAACCC CAGCTTCAGC
      130     140     150     160     170     180
GTAAAGTCCC GTATCGGTGC CAACATGATT TGGGATGCCG AAAAGCCGCG CGTGCTGAAA
      190     200     210     220     230     240
CCAGCGCTTG AACTGGTTGA ACCGACCAGC GGTAATACCG GGATTGCACT GGCCTATGTA
      250     260     270     280     290     300
CGTGCCGCTC GCGGTTACAA ACTCACCTCG ACCATGCCAG AAACCATGAG TATTGAACGC
      310     320     330     340     350     360
CGCAAGCTGC TGAAGGCTT AGGTGCAAC CTGGTGCTGA CGCAAGCTGC TAAAGGCATG
      370     380     390     400     410     420
AAAGGCGCAA TCCAAAAGC AGAAGAAATT GTCGCCAGCA ATCCAGAGAA ATACCTGCTG
      430     440     450     460     470     480
CTGCAACAAT TCAGGAATCC GGCAAACCTT GAAATTCACG AAAAGACCAC CGGTCCGGAG
      490     500     510     520     530     540
ATATGGGAAG ATACCGACGG TCAGGTTCAT GTATTATTG CTGGCCTTGG QACTGCGGCT
      550     560     570     580     590     600
ACGTGGACTG GCGTCACGGC CTACATTAAA GGCACCAAAG GCAAGACCGA TCTTATCTCT
      610     620     630     640     650     660
GTCGCCGTTG AGCCAACCGA TTCTCCAGTT ATCGCCCAGG CGCTGGCAGG TGAAGAGATT
      670     680     690     700     710     720
AAACCTGGCC CGCATAAAAT TCAGGGTATT GCGCGTGGTT TTATCCCGGC TAACCTCGAT
      730     740     750     760     770     780
CTCAAGCTGG TCGATAAAGT CATTGGCATC ACCAATGAAO AAGCGATTTC TACCGCGCGT
      790     800     810     820     830     840
CGTCTGATGG AAGAAGAAGG TATTCTTGCA GGTATCTCTT CTGGAGCAGC TGTGCGCCGG
      850     860     870     880     890     900
GCGTGAAGAC TACAAGAAGA TGAAGCTTT ACCAACAAGA ATATTGTGGT TATTCTACCA
      910     920     930     940     950     960
TCATCGGGTG AGCGTTATTT AAGCACCGCA TTGTTTCCCG ATCTCTTCAC TGAGAAAGAA
      970     980
TTCGAACAGT AATGCCAGCT TG

```

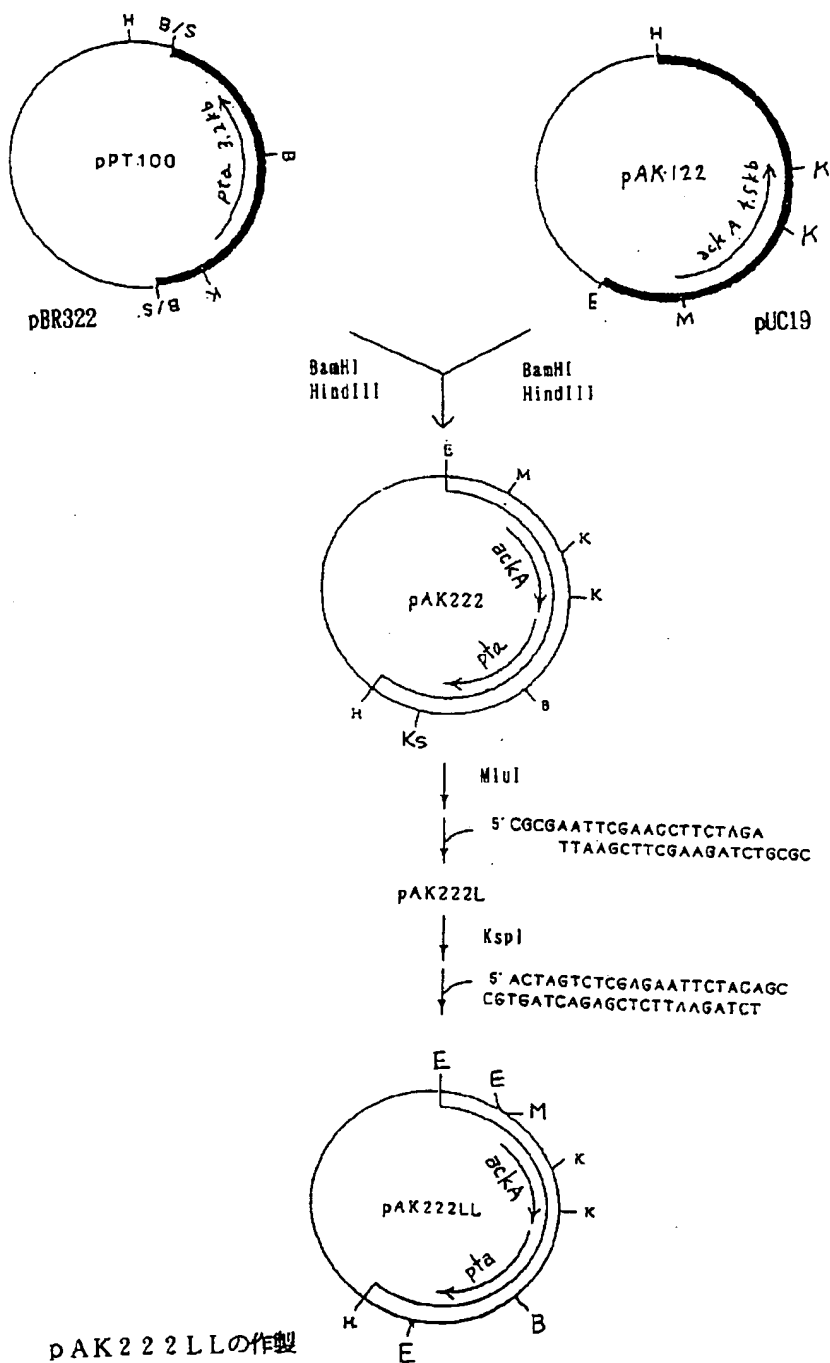
※注コフン

cys K 遺伝子の塩基配列

Base sequence of cys K gene

【図 6】

[FIG. 6]

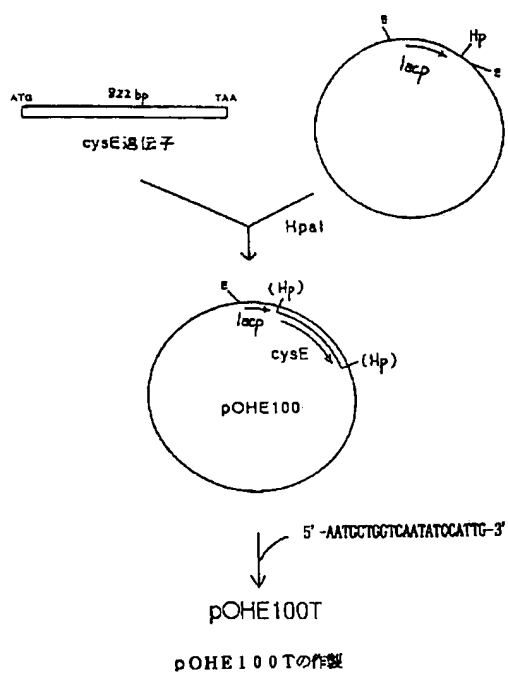


pAK222LLの作製

Manufacture of pAK222LL

【図 7】

[FIG. 7]

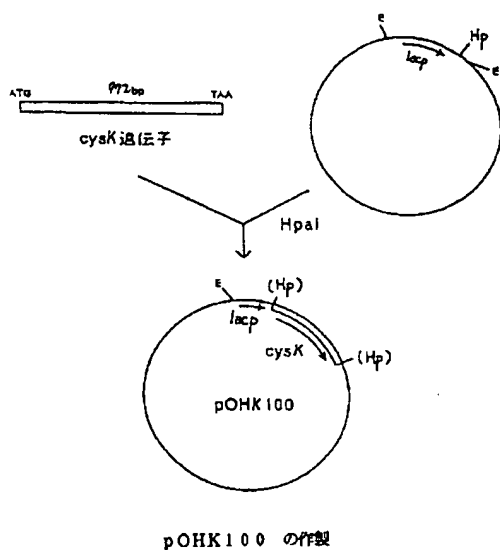


cys E gene

Manufacture of pOHE100T

【図 8】

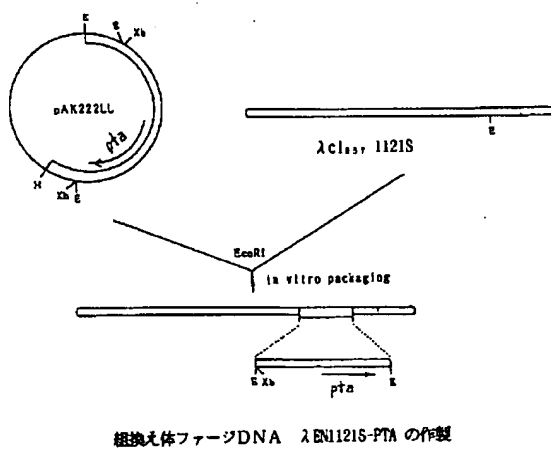
[FIG. 8]



Manufacture of cys K gene  
 Preparation of pOHE100T

【図 9】

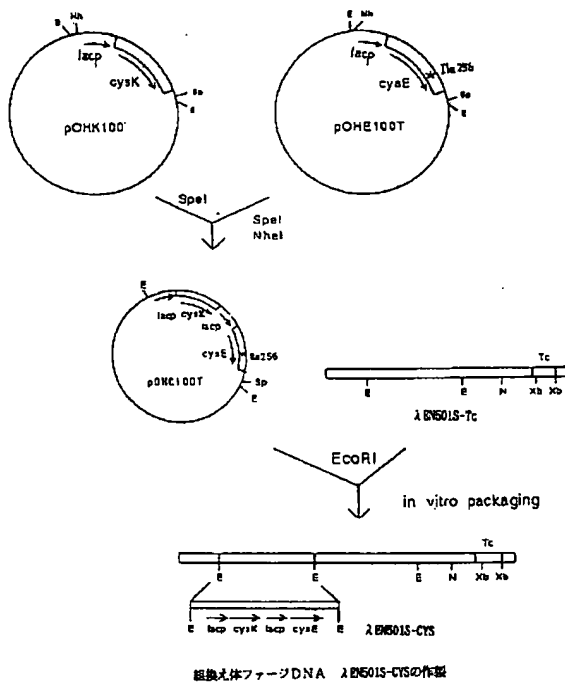
[FIG. 9]



Manufacture of recombinant body phage DNA  $\lambda$  EN1121S-PTA

【図 10】

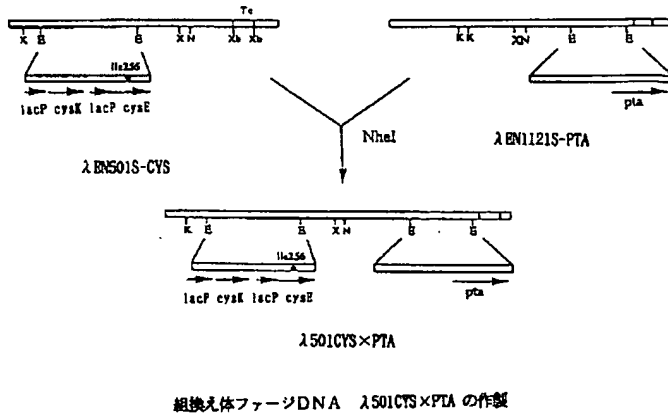
[FIG. 10]



### Manufacture of recombinant body phage DNA $\lambda$ EN501S-CYS

【図 11】

[FIG. 11]



### Manufacture of recombinant body phage DNA $\lambda$ 501CYSXPTA

---

---

---

**【手続補正書】****[AMENDMENTS]****【提出日】** 平成 8 年 7 月 5 日**[FILING DATE]** July 5, Heisei 8**【手続補正 1】****[AMENDMENT 1]****【補正対象書類名】** 明細書**[AMENDED SECTION]** SPECIFICATION**【補正対象項目名】** 0 0 5 0**[AMENDED ARTICLE]** 0050**【補正方法】** 変更**[METHOD OF AMENDMENT]** REWRITE**【補正内容】****[CONTENTS OF AMENDMENT]****【0 0 5 0】**

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、アセトン、脂肪族アルコール、ベンゼンあるいは酢酸エチルなどを用いることができる。これらは、通常、反応液 1 ml 当たり、0.1～50  $\mu$  l、好ましくは 1～20  $\mu$  l の濃度で用いられる。反応温度は、通常 10～60℃、好ましくは 20～50℃、特に好ましくは 36～48℃であり、pH は通常 5～9、好ましくは 6～8.5 である。また、反応は、通常、1～80 時間で完了する。なお、反応中、反応液に通気等の操作で酸素を供給することにより、生成した L-システインを L-シスチンに変

**[0050]**

As an organic solvent, it can use toluene, a xylene, acetone, an aliphatic alcohol, benzene, or ethyl acetate.

These are usually per 1 ml of reaction mixtures, and 0.1-50 microliter, preferably it is used by concentration of 1-20 microliter.

Reaction temperature is usually 10 - 60 degrees C, preferably it is 20 - 50 degrees C, most preferably, it is 36 - 48 degrees C.

PH is usually 5-9, preferably it is 6-8.5.

Moreover, it usually finalizes reaction in 1 to 80 hours.

In addition, formed L- cystein is convertible for L- cystine by supplying oxygen to a reaction mixture by operation of gas-passage etc. among reaction.

Moreover, it can release the feedback inhibition

換することができる。また、L of the SAT activity by L- cystein.  
ーシステインによるSAT活性 Therefore, the reaction yield of L- sulfur  
のフィードバック阻害を解除す containing amino acid is raised.  
ることができる。そのために、  
Lー含硫アミノ酸の反応収率は  
高められる。



## **THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS**

*Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website:

["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)

["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)